

최 종  
연구보고서

벼 개화시기조절 유전자를 이용한 극조생  
벼품종 육성 소재 개발

Application of flowering time genes to  
develop early-heading rice cultivars.

연구기관  
고려대학교

협동연구기관  
농업생명공학연구원

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “벼 개화시기조절 유전자를 이용한 극조생 벼품종 육성 소재 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 7 월 일

주관연구기관명 : 고려 대학교

총괄연구책임자 : 김 정 국

세부연구책임자 : 김 정 국

연 구 원 : 이 정 환

연 구 원 : 이 정 현

연 구 원 : 백 일 선

협동연구기관명 : 농업생명공학연구원

협동연구책임자 : 윤 충 효

연 구 원 : 서 석 철

연 구 원 : 박 범 석

연 구 원 : 차 영 순

연 구 원 : 이 강 섭

연 구 원 : 임 명 호

# 요 약 문

## I. 제 목

벼 개화시기조절 유전자를 이용한 극조생 벼품종 육성 소재 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

식물은 종에 따라 수백 년에 걸친 일생동안 새로운 기관, 예를 들면, 생식 기관(꽃)을 만들어 낼 수 있다. 이와 같은 식물의 놀라운 능력은 성체가 되면 일반적으로 분화가 완료되는 동물과는 큰 대조를 이룬다. 따라서, 식물의 정단 분열조직이 있거나 줄기를 만드는 영양성장기(vegetative growth)에서 꽃을 만드는 생식성장기(reproductive growth)로 전환되는 상전이(phase transition)를 결정하는 기작에 대한 연구는 식물의 발생과 분화과정을 이해하는 데 매우 중요한 의미를 갖는다. 농작물의 경우에도, 개화시기(출수기)는 생산량과 직접 관련이 있기 때문에 연구할 가치가 높다. FCA 유전자는 애기장대에서 1997년 처음 클로닝한 보고가 있는 후, 개화시기 조절경로에서의 그 역할에 대한 연구가 이제 막 시작단계이다.

기술적 측면에서 보면, 쌍자엽 장일식물인 애기장대와는 달리, 단자엽 단일식물인 벼는 꽃의 구조나 성장면에서 많은 차이가 있어 벼 FCA 유전자에 대한 연구성과는 국제적인 수준일 것으로 판단된다. 또한 벼는 단자엽 작물중 대표적인 모델식물이므로 보리, 옥수수, 밀과 같은 다른 작물의 개화시기 조절에 대한 연구에도 응용할수 있을 것으로 사료된다.

경제·산업적 측면에서 보면, 세계 인구증가 및 기상 재해등으로 인한 불안정한 식량수급에 적극적으로 대처하기 위해서는 안정적인 쌀 생산기반을 확보하는 것이 필요할 것이다. 또한 WTO 체제의 출범에 따라 국내 쌀 시장개방과 농촌의 노동인력 감소 및 노령화로 국내 벼 농사의 경쟁력이 약화되는 상황에서 극조생 벼 품종개발은 안정적 쌀 생산기반을 구축하는데 일조할 것이다.

사회·문화적 측면에서 보면, 우리나라에서도 그동안 공업 및 상업 위주의 경제발전의 영향으로 영농인력과 경작지가 지속적인 감소 추세에 있어왔다. 이에

따른 최근 벼 생산량의 감소 추세와 식생활 패턴의 변화에 의한 식량수입 의존도의 증가, 남북한 통일을 대비한 식량문제 그리고 WTO 체제에 따른 국내 쌀 시장개방 등을 고려할 때, 국제 경쟁력이 있는 안정적인 쌀 생산량 증가 방법이 개발되어야만 한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제의 개발 내용 및 범위는 아래와 같다.

◎ 주관연구과제: 벼 개화시기조절 유전자 FCA 및 CO cDNA 기능 및 특성 규명

1. 벼 FCA 유전자의 조직 특이적 및 발생 시기별 발현 양상 분석
2. 애기장대 FCA와 벼 FCA의 기능 비교 분석
3. 벼 FCA 형질전환체의 형태학적 특징 분석

◎ 협동연구과제: 벼 FCA의 유전자 분리 및 FCA의 형질전환체 생산

1. 벼 FCA 유전자의 genomic clone 확보 및 특성규명
2. 벼 FCA의 분자유전자 지도상의 위치 결정
3. 벼 FCA 형질전환체 생산을 통한 조기개화 가능성 타진
4. 벼 CO 형질전환체 생산

### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

◎ 연구개발 결과

1. 벼 개화시기조절 유전자 FCA 및 CO cDNA 기능 및 특성규명

애기장대에서 FCA 유전자는 광주기에 영향을 안 받는 자발적 경로를 통해 개화시기를 조절한다. 본 연구팀은 애기장대 FCA유전자와 유사성을 갖는 homolog에 대한 cDNA와 유전자를 분리하였다. 이 유전자의 cDNA는 애기

장대 FCA v cDNA와 가장 유사성이 높고 830개의 아미노산을 구성한다. 벼의 FCA homolog는 두개의 RNA 결합부위와 한개의 WW 단백질 결합부위를 갖는데, 이 부위에서 애기장대 FCA 단백질과 70-80%의 아미노산 상동성을 갖는다. 본 연구팀은 이 유전자를 OsFCA라 명명하였다. RT-PCR과 데이터베이스 검색을 통해서 인트론3의 차등적 접속과정과 폴리아데닐레이션이 벼에서도 진화적으로 보존되어있음을 알 수 있었다. 이 사실은 FCA의 인트론3가 FCA pre-mRNA의 차등적 접속과정 조절에 중요한 조절부위라는 것을 알 수 있었다. Genomic Southern blot의 결과로 애기장대와 마찬가지로 벼에서도 FCA유전자가 한 copy라는 것을 알 수 있었다. OsFCA 유전자의 발현은 어린 조직(지상부위와 뿌리), 줄기, 꽃에서 많이 되었으며, 특히 어린 꽃조직에서 많이 관찰되었다. 그러나, 성숙한 줄기나 뿌리에서는 거의 발현양상이 보이지 않았다. 애기장대 *fca-1* 돌연변이체에 OsFCA 유전자를 35S promoter를 이용하여 과다발현시켰을 시 애기장대 *fca-1* 돌연변이체의 늦은 개화시기가 회복됨을 알 수 있었다.

벼에서 애기장대의 다른 개화시기 조절 유전자중에서 애기장대의 CO과 AGL20 homolog로 추정되는 것을 연구대상으로 삼았다. 벼의 CO 유사 유전자(NCBI 등재번호; AB001887)는 애기장대의 CO 유사 유전자들과 아미노산 서열에서 높은 유사성을 나타내었다. 유전자 발현에서는 애기장대의 개화를 조절하는 경로 중 광주기 경로에 있는 GI, CO, FT와 같은 유전자들처럼 하루를 주기로 시간에 따른 주기적 발현양상을 보였다. 또한, 공간적 발현양상 조사에서 영양생장기에는 약하게 발현되고 panicle의 발달시기에 강하게 발현되는 것으로 관찰되었다. 애기장대 AGL20과 70%의 아미노산 유사성을 보이는 FDRMADS8(NCBI 등재번호; AF141965)의 경우는 꽃기관 결정에 관여하는 다른 MADS box 유전자들과 유사성을 비교했을 시에는 상대적으로 낮았다. 그리고, AGL20과 유전체 구조를 비교했을 시에는 인트론의 삽입부위, 상대적 크기, 수가 유사한 경향을 보였다. 또한, 계통분석에서 다른 MADS box 단백질보다 애기장대 AGL20 유전자에 더욱 근접함을 알 수 있었다. 벼에서 조직별 발현양상을 분석했을 시 애기장대 AGL20의 발현양상과 유사한 양상을 보였다. 이 중에서 FDRMADS8을 벼에 과다발현시킨 형질전환체를 만들었으며, 또한 애기장대 FT를 벼에 과다발현시킨 형질전환체를 만들어 분석중에 있다.

## 2. 벼 FCA의 유전자 분리 및 FCA 형질전환체 생산

OsFCA 유전자의 genomic clone을 얻기 위해 미국의 Clemson University에서 구입한 BAC library를 OsFCA cDNA를 탐침으로 screening하였다. 이를 통해 16개의 BAC clone을 선발하여 다시 HindIII를 처리한 후 Southern blot을 수행하여 09G08 BAC clone으로부터 약 11.5kb의 HindIII 단편이 OsFCA 전체 유전자를 포함한다는 것을 알아내었다. OsFCA 유전자는 17개의 엑손과 16개의 인트론을 포함하고 있었으며, 유전자의 구조는 애기장대 FCA와 전체적으로 유사하였다. 애기장대와 벼의 FCA 유전자의 구조는 인트론의 수, 크기, 삽입위치에서 거의 유사하였다. 애기장대 FCA의 인트론3 크기는 2076bp로 가장 길었고, 다른 인트론의 크기는 81-361bp 정도였다. 유사하게 벼 FCA의 인트론3 크기는 2503bp로 가장 길었고, 다른 인트론의 크기는 69-661bp 정도였다. 지금까지 벼에서 밝혀진 출수기에 관련된 QTL은 14개이며, OsFCA 유전자의 벼 염색체상의 위치는 염색체 9번 상단에 존재하였다. 아직까지 그 위치에서는 출수기에 관련된 QTL이 확인된 바가 없다.

애기장대 FCA 유전자는 과다발현시 개화시기를 앞당기기 때문에 벼에서 출수기를 조절하기 위해 OsFCA 유전자의 유용성을 확인해보았다. Cauliflower 모자의 바이러스의 35S 프로모터를 이용하여 OsFCA cDNA를 과다발현시킬 pB2PFT 형질전환백터를 agrobacterium을 이용하여 벼에 형질전환시켰다. Basta 저항성을 가진 형질전환체로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR과 genomic Southern blot을 통해 형질전환 유전자의 존재를 확인하였다. 46개의 형질전환체가 형질전환 유전자를 가지고 있음을 확인하였다. 온실과 GMO 포장에서 키운 형질전환체의 출수기가 다른 벼품종인 운두벼, 소백벼, 낙동벼, 그리고 일품벼의 출수기와 비교를 하였다. 대부분의 형질전환벼의 출수기가 극조생 벼품종의 출수기에 비해 1주나 1주정도 늦음이 확인되었다.

또한, 극조생 벼품종의 개발을 위해 다른 개화시기 조절 유전자의 Os CO-like와 Hd-1 유전자를 가진 형질전환체를 만들어 분석중에 있다.

## ◎ 활용방안

본 연구과제의 결과가 벼의 개화시기를 조절하는데 이용할 수 있는 것으로 판단되며, 극조생벼 품종개발에 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 극조생벼품종은 국내에서도 경쟁력있는 2모작이 실현가능 하도록 할 것이며, 보리, 옥수수, 밀과 같은 타작물의 개화시기 조절 연구에도 응용될 수 있어, 이와 같은 타작물의 분자유종에 활용될 수 있을 것이다. 본 연구결과로 얻어질 수 있는 극조생종 벼종자가 실제로 벼농사를 하는 농민들에게 보급되기까지는 육종학자들에 의한 장기간의 포장시험을 통한 품종의 안정화가 이루어져야 할 것으로 보고 있다.

## SUMMARY

### (영문요약문)

1. The analysis of function and characterization of the rice flowering time gene, OsFCA and OsCO-like

In Arabidopsis, FCA regulates flowering time via a pathway that is independent of daylength. We isolated a cDNA clone and its genomic clone from rice, which showed significant homology to FCA. The cDNA clone contains an open reading frame of 830 amino acids, having homology with the predicted protein of the FCA  $\gamma$  transcript. The two RNA binding domains and a WW protein interaction domain of the rice cDNA-encoded protein have about 70- 80 % amino acid identity with those of the FCA  $\gamma$  protein. Therefore, we designated this gene as OsFCA. RT-PCR and in silico search also revealed that the alternative splicing and polyadenylation of intron 3 were conserved in rice. It is speculated that the intron 3 of the FCA might be a major control point for alternative splicing of the FCA pre-mRNA. Genomic Southern data indicated that the OsFCA was presumably a single copy gene in rice genome like FCA in Arabidopsis genome. The OsFCA transcripts were detectable in young tissues (aerial tissue and roots), stems, and flowers, except that flowers of younger stages showed higher transcript level, but not in matured leaves and roots. Ectopic overexpression of the OsFCA using 35S promoter in Arabidopsis *fca-1* could partially rescue the late-flowering phenotype of the *fca-1*. These data suggest that the OsFCA may be a functional homolog of the FCA.

From rice (*Oryza sativa* L.) DNA sequence databases, two cDNA clones [AB001887 and AF141965] with significant similarity to the Arabidopsis flowering time genes was found. The cDNA clone [AB001887]



shows significant amino acid sequence homology (53%) with Arabidopsis COL2. The expression of the photoperiod pathway genes such as GI, CO, COL1 and COL2 are under circadian control in Arabidopsis. Recently, the expression of the rice homologues of Arabidopsis GI, CO, and FT was shown to be under circadian control. The expression pattern of the rice homologue of CO family is investigated. The expression pattern of OsCO-like gene [AB001887], rice homologue of Arabidopsis COL, was under circadian control. And OsCO-like gene transcript is more abundant at the late panicle development stages than earlier stages and vegetative stages. In the case of FDRMADS8 [AF141965] which is significant similarity with Arabidopsis AGL20, there was higher amino acid similarity score, compared with other rice MADS box genes involved in floral organ identity. The structure of this genes was similar to AGL20 in terms of the insertion site, relative size, and number of the introns. Phylogenic analysis also revealed that the amino acid sequence of FDRMADS8 was closer to Arabidopsis AGL20 than other MADS box proteins. To investigate gene expression of this gene, we performed northern blot analysis in rice. This gene is expressed in panicle and seedling developmental stages. These ubiquitous expression patterns are similar to those of Arabidopsis AGL20 gene.

Also, the transgenic rice plants overexpressing rice FDRMADS8 and Arabidopsis FT were made and their characteristics are being examined.

2. The isolation of the OsFCA gene and the production of OsFCA transgenic rice plants

In order to obtain the genomic clone of the OsFCA, the rice BAC library (CUGI) filter was screened with it's cDNA clone. From this experiment, sixteen positive BAC clones were obtained. Southern blot was also performed to obtain the genuine BAC clone containing OsFCA gene.

An 11.5kb HindIII fragment obtained from BAC clone 09G08 turned out to contain the full-length gene for the OsFCA cDNA clone. The OsFCA gene consists of 17 exons and 16 introns. The structure of this gene is similar to that of FCA in general. That is, the OsFCA and the FCA are similar in general to each other in terms of the insertion site, relative size, and number of introns. The intron 3 of the FCA is 2076 bp long while the size of other introns is between 81 bp and 361 bp. Similarly, the intron 3 of the OsFCA is 2503 bp long, but the size of other introns is between 69 bp and 661 bp. So far, fourteen OTLs for heading date were identified through molecular marker-based mapping in rice. The chromosomal position of OsFCA is examined using recombinant inbred lines. There is no known QTL for heading date on upper position of chromosome 9, but the OsFCA was mapped on it.

Since the flowering time gene FCA can accelerate flowering in Arabidopsis, the usefulness of OsFCA for manipulating heading date in rice has been tested. Plasmid pB2PFT, which contains a OsFCA cDNA driven by the cauliflower mosaic virus 35S promoter, was transformed via Agrobacterium-mediated method. Rice genomic DNA was extracted from basta resistant lines (T2), and the presence of the transgene was determined by polymerase chain reaction (PCR) using transgene specific primer, which amplify a 499 bp fragment of OsFCA cDNA. Also, genomic Southern blot was performed. Forty six independent T2 lines were shown by PCR and genomic Southern blot to contain the OsFCA cDNA transgene. The heading date of the putative 35S::OsFCA transgenic rice plants was determined. Many independent transgenic lines were grown in greenhouse and GMO paddy field and the heading date of them was compared with some rice cultivars (Undo-byo, Sobak-byo, Nakdong-byo, and Ilpoom-byo). The heading date of many transgenic lines grew slowly than this of early rice cultivars, with one or two weeks.

Also, in order to test the possibility of early heading rice cultivars, the

transgenic line of other flowering time genes (Os CO-like and Hd-1) were made.

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

|   |     |
|---|-----|
| <b>Chapter 1. General introduction</b> . . . . .  | 14  |
| Section 1. Purpose of research development . . . . .  | 14  |
| Section 2. Necessity of research development . . . . .  | 14  |
| Section 3. Area of research development . . . . .   | 16  |
| <br>  |     |
| <b>Chapter 2. The present position of internal and external technical development</b> . . . . .                               | 17  |
| Section 1. The present position and problems of technical development about internal and external related field . . . . .     | 17  |
| Section 2. The occupied position of research results in internal and external technical development . . . . .                 | 21  |
| <br>  |     |
| <b>Chapter 3. The contents and results of research development achievement</b> . . . . .                                      | 22  |
| Section 1. Theoretical and experimental methods . . . . .   | 22  |
| Section 2. Research contents . . . . .  | 36  |
| Section 3. Results and discussion . . . . .   | 39  |
| <br>  |     |
| <b>Chapter 4. The achievement of attainment of object and related field</b> . . . . .   | 120 |
| Section 1. The achievement index of purpose of research development based on annual research purpose and estimation . . . . . | 120 |
| Section 1. The achievement of technical development of related field . . . . .  | 121 |
| <br>  |     |
| <b>Chapter 5. The application plan of research development result</b>   |     |

..... 123

Chapter 6. The information of scientific techniques obtained  
from abroad during research development ..... 124

Chapter 7. References ..... 125

# 목 차

|   |     |
|---|-----|
| <b>제 1 장 연구개발과제의 개요</b> . . . . .                 | 14  |
| 제 1 절 연구개발의 목적 . . . . .                          | 14  |
| 제 2 절 연구개발의 필요성 . . . . .                         | 14  |
| 제 3 절 연구개발의 범위 . . . . .                          | 16  |
| <b>제 2 장 국내외 기술개발 현황</b> . . . . .                | 17  |
| 제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 문제점 . . . . .         | 17  |
| 제 2 절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 . . . . .       | 21  |
| <b>제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과</b> . . . . .             | 22  |
| 제 1 절 이론적, 실험적 접근방법 . . . . .                     | 22  |
| 제 2 절 연구내용 . . . . .                              | 36  |
| 제 3 절 연구결과 . . . . .                              | 39  |
| <b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b> . . . . .         | 120 |
| 제 1 절 연차별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 . . . . . | 120 |
| 제 2 절 관련분야의 기술발전에의 기여도 . . . . .                  | 121 |
| <b>제 5 장 연구개발결과의 활용계획</b> . . . . .               | 123 |
| <b>제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보</b> . . . . .      | 124 |
| <b>제 7 장 참고문헌</b> . . . . .                       | 125 |

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발의 목적

식물은 종에 따라 수백 년에 걸친 일생동안 새로운 기관, 예를 들면, 생식기관(꽃)을 만들어 낼 수 있다. 이와 같은 식물의 놀라운 능력은 성체가 되면 일반적으로 분화가 완료되는 동물과는 큰 대조를 이룬다. 따라서, 식물의 정단 분열조직이 있거나 줄기를 만드는 영양성장기(vegetative growth)에서 꽃을 만드는 생식성장기(reproductive growth)로 전환되는 상전이(phase transition)를 결정하는 기작에 대한 연구는 식물의 발생과 분화과정을 이해하는 데 매우 중요한 의미를 갖는다 (Weigel, 1995; Ratcliffe et al., 1998). 연구대상 식물은 벼로 단자엽식물의 모델식물이며 세계인구의 약 30%가 주식으로 삼는 곡물이기도 하다. 연구결과는 단자엽식물의 개화시기 조절경로에 대한 지식을 확대시킬 것이며, 지식은 채소나 과일뿐만 아니라 곡물의 생산성을 결정하는 중요한 요인이므로 농업적으로도 응용될 수 있을 것으로 기대한다. 따라서, 본 연구에서는 벼에서 개화시기 조절 유전자를 찾아 그 유전자의 유용성을 탐색하는 것을 목적으로 한다.

### 제 2 절 연구개발의 필요성

#### 1. 기술적 측면

현화식물의 번식전략은 크게 발아, 영양생식, 개화, 종자형성과 분산으로 요약해 볼 수 있는데, 그 중 개화시기 조절이 생존의 핵심적인 부분이라 할 수 있다. 이러한 이유로 개화시기를 조절하는데 관여하는 유전자에 대한 연구가 아주 활발하다. 농작물의 경우도, 개화시기(출수기)는 생산량과 직접 관련이 있기 때문에 연구할 가치가 높다. FCA 유전자는 애기장대에서 1997년 처음 클로닝한 보고가 있는 후, 개화시기 조절경로에서의 그 역할에 대한 연구가 이제

막 시작단계이다. 쌍자엽 장일식물인 애기장대와는 달리, 단자엽 단일식물인 벼는 꽃의 구조나 성장면에서 많은 차이가 있어 벼 FCA 유전자에 대한 연구 성과는 국제적인 수준일 것으로 판단된다. 또한 벼는 단자엽 작물중 대표적인 모델식물이므로 보리, 옥수수, 밀과 같은 다른 작물의 개화시기 조절에 대한 연구에도 응용할 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구과제에서 얻어지는 벼의 개화시기(출수기) 조절에 관한 분자생물학적 지식과 벼 염색체상의 유전자 위치 결정 및 형질전환체 생산은 극조생종을 육종하려는 학자들에게도 좋은 학술적 정보를 제공할 것이다.

## 2. 경제·산업적 측면

세계 인구증가 및 기상 재해 등으로 인한 불안정한 식량수급에 적극적으로 대처하기 위해서는 안정적인 쌀 생산기반을 확보하는 것이 필요할 것이다. 또한 WTO 체제의 출범에 따라 국내 쌀 시장개방과 농촌의 노동인력 감소 및 노령화로 국내 벼농사의 경쟁력이 약화되는 상황에서 극조생 벼 품종개발은 안정적 쌀 생산기반을 구축하는데 일조 할 것이다. 마지막으로, 국내 벼 재배면적의 감소(3만 ha 감소/년)에 따른 쌀 생산성 감소는 극조생종 벼 개발에 의한 벼 재배 가능 지역을 확대함으로써 억제할 수 있을 것이다.

## 3. 사회·문화적 측면

벼는 전 세계인구의 반 이상이 주식으로 이용하는 중요한 작물이나 앞으로 식량증산이 인구증가를 충족하지 못하여 세계 식량위기가 예측되고 있다. 우리나라에서도 그동안 공업 및 상업 위주의 경제발전의 영향으로 영농인력과 경작지가 계속적인 감소 추세에 있어왔다. 이에 따른 최근 벼 생산량의 감소 추세와 식생활 패턴의 변화에 의한 식량수입 의존도의 증가, 남북한 통일을 대비한 식량문제 그리고 WTO 체제에 따른 국내 쌀 시장개방 등을 고려할 때, 국제 경쟁력이 있는 안정적인 쌀 생산량 증가 방법이 개발되어야만 한다.



## 제 2 절 연구개발의 범위

| 구 분  | 연구 개발 목표   | 연구개발 범위   |
|------|--|---|
| 1차년도 | <ol style="list-style-type: none"> <li>벼 FCA 유전자의 조직 특이적 및 발생시기별 발현 양상 분석</li> <li>벼 FCA 유전자의 genomic clone 확보 및 염기서열 결정</li> </ol>                          | <ol style="list-style-type: none"> <li>FCA 유전자의 alternatively-spliced transcript 유무 확인</li> <li>Wild-type의 벼 조직특이적 및 발생시기별 FCA 발현 분석</li> <li>벼 FCA 유전자의 genomic cloning 및 특성 규명</li> <li>염기서열 결정 및 promoter 분석</li> </ol>  |
| 2차년도 | <ol style="list-style-type: none"> <li>애기장대 FCA와 벼 FCA의 기능 비교 분석</li> <li>FCA 유전자의 벼 분자유전자 지도상의 위치결정</li> <li>벼 FCA 형질전환체 생산</li> <li>CO 형질전환체 생산</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>애기장대 <i>fca-1</i> mutant에 벼 FCA 유전자를 형질전환시켜 complementation 여부 분석</li> <li>형질전환 애기장대내에서 다른 개화시기조절 유전자들의 발현양상 분석</li> <li>RFLP등의 marker와의 연관여부를 조사하여 벼 분자 유전자지도상의 위치 확인</li> <li>Agrobacterium-mediated transformation 방법을 이용한 벼 형질전환 수행</li> </ol> |
| 3차년도 | <ol style="list-style-type: none"> <li>벼 FCA 형질전환체의 형태학적특징 분석</li> <li>벼 FCA 형질전환체의 조기 개화 가능성 타진</li> </ol>  | <ol style="list-style-type: none"> <li>벼 형질전환체의 꽃 발달 과정을 추적/분석하여 wild-type 벼와 비교</li> <li>형질전환체에서 개화시기조절 유전자들의 발현양상 분석</li> <li>벼 형질전환체 생산 계속</li> <li>T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> 형질전환 벼를 조사하여 기존의 개발된 극조생 품종과의 출수기 비교분석</li> </ol>   |

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 문제점

#### 1. 극조생 벼 육종현황과 문제점

온대기후 지대인 우리나라는 벼 재배에 있어서 거의 해마다 상습적인 기상재해(태풍, 홍수, 냉해)로 인한 피해를 경험하게 되므로 벼 품종의 기상재해에 대한 저항성은 안정적인 벼 재배를 위해 해결되어야 할 중요한 품종개량 목표이다. 기상재해에 대한 저항성을 지닌 벼 품종 개발노력의 일환으로 논벼 품종의 숙기도 다양하게 개발되었는데, 11개의 극조생 품종, 7개의 조생 품종, 18개의 중생 품종, 18개의 중만생 품종이 개발되어 농민들의 품종 선택폭을 크게 확대하였다(농진청, 1995a). 이러한 노력은 최근까지 계속되어 흑진주벼, 운두벼와 같은 출수기가 기존에 개발된 극조생종(오대벼, 진부벼, 소백벼)보다 더 앞당겨진 신품종이 개발되었다. 흑진주벼는 흑자색 양질의 유색미로서 북부평야지 및 중산간지 보통기보비 재배 및 중부평야의 2모작에 적응하는 극조생종으로 보고되었으며(문헌팔, 1998), 출수기는 중부평야와 중남부 중간지 및 중산간지 재배에서 7월 25일 경으로 오대벼보다 약 1주일 정도 빠른 극조생종으로 알려져 있다. 그러나 쌀 수량성이 오대벼의 약 75%수준이며 흰잎마름병 및 벼멸구등의 병충해에 약하고, 도복에도 약한 단점을 가진 것으로 보고하고 있다. 한편, 운두벼의 경우는 보통기 재배시, 북부평야, 중산간지 및 동해안 북부 중산간지에서 출수기가 7월 26일이고, 중북부 고랭지에서는 8월 1일로서 오대벼에 비해 8일 내지 10일 정도 그리고 소백벼에 대해서는 3~4일 정도 빠른 품종으로 보고되었으며(유해영, 1999), 내냉성이 강하여 기온이 낮은 산간 고랭지에 재배가 적합한 것으로 보고하고 있다. 쌀 수량성은 북부평야지 및 중산간지대에서는 오대벼 및 소백벼와 비슷하나 중남부 평야지에서 보통기에 재배할 경우 쌀 품질이 떨어지는 것으로 알려져 있다. 운두벼 역시 흑진주벼와 마찬가지로 병충해에 약한 단점을 가지고 있다. 흑진주벼와 운두벼 이외에도 인월벼,

삼천벼등이 개발되었으나, 출수기는 운두벼와 흑진주벼보다 느리며 도열병에는 저항성을 보이거나 기타 병충해에는 약한 것으로 알려져 있다(양보갑외, 1997; 양보갑 1999).

한편, 우리나라보다 벼농사를 하기 위한 기후조건이 부적절한 것으로 생각되는 북한(류인수외, 1996)과 북부중국(심양)에서 재배되는 품종들의 출수기를 국내에서 재배하여 조사해 본 결과 북한 품종인 평북3호의 경우 오히려 오대벼에 비해 6일정도 늦었으며(한희석, 1997), 중국 품종의 출수기는 한국의 조생종의 출수기인 7월 27일에서 8월 2일경인 것으로 나타났다(조영철외, 1997). 이 결과들은 통일을 대비한 극조생종 벼 품종개발이 얼마나 중요한 문제인가를 보여주고 있다.

위에서 설명한 바와 같이 국내 벼 육종학자들에 의해 극조생종 개발노력이 있어 왔으나 개발된 품종들이 내냉성은 좋으나 일반적으로 병충해에 약한 단점을 가지고 있는 상황이다. 본 연구에서는 벼 개화시기(출수기)에 관여하는 유전자를 조작하여 병충해, 냉해등에 강한 저항성을 가지는 다수량 품종을 형질전환시켜 극조생종이면서도 다른 좋은 형질을 그대로 유지하고 있는 품종을 개발하려는 것을 장기적인 목표로 설정하고 있다.

## 2. 자발적인 개화유도 경로(autonomous Promotion Pathway)와 FCA

자발적인 개화유도경로에 관련하는 유전자들, FPA, FVE, FLD, LD, FY, FCA, TFL1, FLC, FRI 중 몇 개는 클로닝이 되어 기능분석이 되었다 (그림 1). LD는 homeodomain을 가진 Transcription Factor로 생각되며, LD mRNA는 식물체 전체부위에서 발현되나, shoot apex나 root apex에서 가장 많이 발현된다(Lee *et al.*, 1994). TFL1은 phosphatidyl ethanolamine binding protein과 유사성을 지닌 단백질이며, 개화유도를 억제하는 repressor로 작용한다(Bradley *et al.*, 1997; Ohshima *et al.*, 1997). FLC는 MADS domain을 가진 단백질로서 역시 개화유도를 억제하는 repressor로 작용한다(Michaels and Amasino, 1999; Sheldon *et al.*, 1999). FCA는 특이하게도 RNA binding domain과 protein-protein interaction domain을 가진 단백질이다(Macknight *et al.*, 1997). FCA의 RNA binding domain은 *Drosophila*의 SXL과 ELAV 단

백질의 것과 아주 유사한데 이 두 *Drosophila* 단백질은 *Drosophila*에 있어서의 성(sex)결정과 Neuron의 분화에 중요한 pre-mRNA의 alternative splicing에 관여한다(Bell *et al.*, 1988; Koushika *et al.*, 1996). 따라서 FCA는 개화에 관련된 유전자들의 posttranscriptional regulation에 관여할 것으로 생각되며, FCA transcript 자체도 alternative splicing을 하는 것으로 알려져 있어 자기 자신의 posttranscriptional regulation에 관여할 가능성이 있다. FCA를 형질전환식물체에 과량발현시키면 조기개화를 유도할수 있다는 보고(Page *et al.*, 1999)는 FCA가 유전공학 기법을 이용한 개화시기 변경식물체 생산에 이용될 수 있음을 시사하는 것이다.

### 3. 벼의 개화시기조절 유전자에 대한 연구현황

개화시기(출수기)는 곡물의 생산량에 직접적인 영향을 미치므로 곡물의 개화 시기 조절에 관여하는 유전자들에 대한 연구가 있어왔다(Laurie, 1997). 그러나 쌍자엽 모델 식물인 *Arabidopsis*에 비하면 아직 시작단계에 불과하다고 볼 수 있다. 단자엽 모델 식물이라 할 수 있는 벼의 경우, 출수기에 관여하는 QTL들이 확인되었으나(Li *et al.*, 1995; Yano *et al.*, 1997) 실제로 유전자가 클로닝되어 기능이 분석된 것은 MADS domain을 가진 단백질의 유전자라 볼 수 있다(Chung *et al.*, 1994). 지금까지 여러 개의 MADS domain을 가진 유전자들이 알려져 있는데 그 중 OsMADS1은 담배에 과량발현시켰을 경우 담배의 개화시기를 앞당길 수 있다고 보고되었으나 이미 알려진 다른 OsMADS 유전자와 마찬가지로 개화시기를 결정하는데 직접 관여한다기 보다는 애기장대의 AP1이나 AG 같은 floral meristem identity gene들이라고 생각된다(Moon *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 1998). 애기장대의 또다른 floral meristem identity gene인 LFY와 약 44%의 아미노산서열 동일성을 보이는 유전자 RFL이 벼에서 발견되었는데, 이 RFL의 기능은 애기장대의 LFY의 기능과는 차이점이 있으며, 벼의 panicle branching과 관련있을 것으로 추정하고 있다(Kyozuka, 1997). 벼의 꽃분화 및 배발생에 관여하는 단백질로서 KN1-type의 homeobox gene family에 속하는 OSH 단백질들과 OSKN 단백질들이 보고되어 있으나 이들이 벼의 개화시기조절과 관련하여 어떠한 역할을 하는지는 알

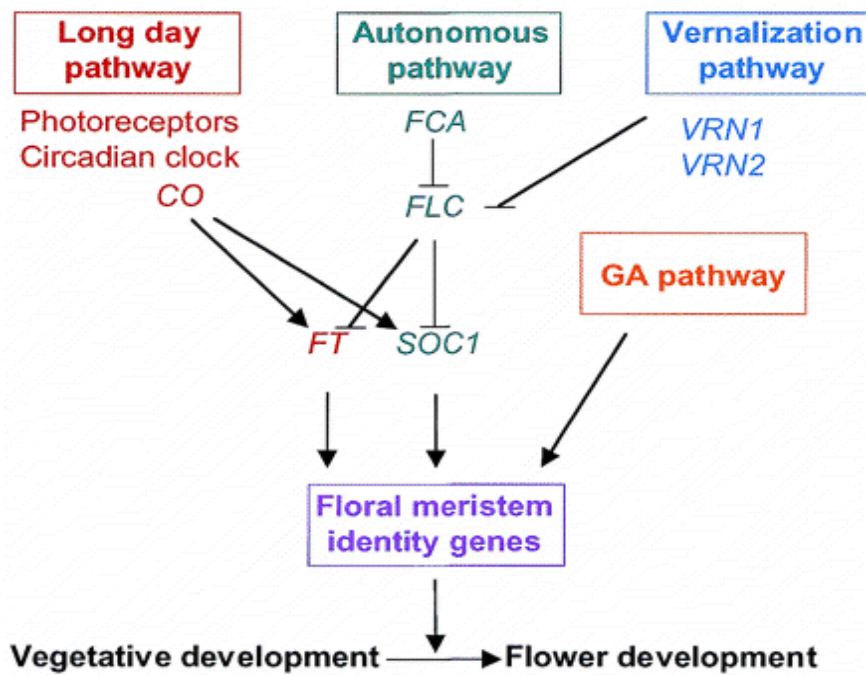


그림 1. 애기장대에서 꽃개화시기를 조절하는 유전자들의 최근 모식도. 광주기 경로, 춘화처리 경로, 지베렐린 경로, 그리고 자발적 경로가 표시되어 있다. 각 경로로부터 입수된 정보들이 집약(pathway integration)되어 영양생장분열조직에 개화유도에 필요한 신호를 전달하여 생식생장분열조직으로 전환하도록 하는 것이 개화시기 조절의 전체적인 흐름이다. (John Innes Centre/C. Dean group)

려진 바가 없다(Sentoku *et al.*, 1999; Postma-Haarsma *et al.*, 1999). 한편 개화시기를 결정해주는 네 가지 경로(photoperiod pathway, autonomous pathway, vernalization pathway, gibberellin pathway)에 관련된 유전자로서 벼에서 클로닝되어 분석된 것은 phytochrome A가 있고, 애기장대의 CO와 46%에서 61%의 아미노산 서열 유사성을 보이는 3개의 cDNA클론이 확인된 정도이며(Song *et al.*, 1998), 나머지 대부분의 유전자는 아직 클로닝되지 않은 상태이다.

본 총괄연구책임자 연구팀은 최근 애기장대의 FCA의 homolog로 생각되는 cDNA clone을 벼로부터 찾아내었다. 이 cDNA 클론은 두 개의 RNA binding domain(RBD)을 가지고 있는데 애기장대 FCA의 두 RBD들과 각각 90%와 78%의 아미노산서열 동일성을 가지고 있다. 또한 protein-protein interaction domain인 WW domain도 78%의 아미노산서열 동일성을 보인다. 전체적인 아미노산서열 유사성은 35%로 다른 개화와 관련된 벼 유전자의 경우에 비해 다소 낮은 편이다. 그러나, 이것은 벼 FCA homolog로 생각되는 cDNA의 경우, 아미노산 말단 쪽에 애기장대와는 달리 Glycine residue가 아주 많이 존재하는 것이 주된 원인이다.

## 제 2 절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

벼 유전체의 초벌 전체 염기서열결정이 최근에 완료되어, 이에 따른 functional genomics 연구도 활발히 시작되고 있는 상황이다. 벼 개화시기(출수기)조절에 대한 연구는 벼 유전체와 functional genomics의 연구결과에 크게 도움을 받게 되어 애기장대의 개화시기조절에 관련되는 유전자 연구가 곧바로 벼의 연구로 확장될 것이며, 이것은 다시 comparative genomics의 연구결과로 보리, 옥수수, 밀과 같은 타 작물의 개화시기(출수기)조절에 대한 연구로 직결될 것이다. 개화시기(출수기)의 결정은 작물의 생산성과 직접적인 관계가 있으므로 출수기가 변경된 새로운 품종개발이 이루어 질수 있을 것으로 사료된다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 이론적, 실험적 접근 방법

#### 1. 벼 개화시기조절 유전자 FCA의 기능 및 특성 규명

##### 가. FCA 유전자의 조직 특이적 및 발생시기별 발현양상 분석

##### 1) 벼 FCA 유전자의 alternatively-spliced transcript 유무확인

##### 가) RACE-PCR과 RT-PCR 수행 및 Northern 분석

애기장대의 genomic FCA 유전자의 경우 크기는 8.1kb로 여기서 네가지의 spliced transcript (FCA $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ )가 나오는 것으로 알려져 있다 (Macknight *et al.*, 1997). 우선적으로 이들 alternatively-spliced transcript는 모두 5'쪽을 공통적으로 가지고 있기 때문에 5'UTR에서 primer를 잡아서 adaptor에 있는 primer와 함께 3'RACE-PCR을 수행하였다. 먼저 OsFCA 유전자가 많이 발현되는 어린 panicle 조직에서 total RNA를 분리하였다. 우선 조직 1g을 막자사발에서 곱게 간 후 여기에 TRI reagent 1ml을 첨가하고 상온에서 5분 반응시켰다. 여기에 200ul chloroform을 첨가하고 잘 섞어준 후 상온에서 10분 놔두고 12,000g에서 15분 원심분리를 하였다. 상등액을 취해서 500ul isopropanol을 첨가하고 섞어준 후 상온에서 10분 놔두고 12,000g에서 8분 원심분리하였다. RNA pellet에 75% ethanol을 1ml 첨가한 후 다시 7,500g에서 5분 원심분리하고 상온에서 말린후 100-200ul DEPC-water를 첨가하여 녹였다. 녹인 total RNA는 사용전까지 -70℃에 보관하였다. 3'RACE-PCR은 Clontech에서 나온 kit를 이용하였다. 먼저 추출한 total RNA에서 reverse transcriptase, dNTP, random primer를 이용하여 42℃에서 cDNA를 합성한 후 adaptor를 붙였다. 합성된 cDNA를 주형으로 adaptor primer(API primer; 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'), 유전자 특이 서열 primer,

PCR reaction buffer, dNTP, advantage cDNA polymerase mix를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 touch down 조건(94°C, 1min; 5 cycles of 94°C, 30sec/ 72°C, 4min; 5 cycles of 94°C, 30sec/70°C, 4min; 25 cycles of 94°C, 20sec/ 68°C, 4min)을 사용하였다. PCR 반응이 끝난 후 1.5% agarose gel에서 전기영동 후 capillary 방법을 통해 nylon membrane으로 전이시켰다. 완성된 blot은 UV로 고정시키고 60°C에서 6\*SSC, 5\*Denhardt's solution, 0.5% SDS, 100ug/ml salmon sperm DNA에서 17-20시간 혼성화 반응을 시켰다. 그 후에 적당한 SSC solution으로 washing을 수행한 후 IP plate로 expose한 후 Phosphorimager로 확인을 하였다.

$\alpha$  transcript의 경우는 발현양이 세포내에서 1%이하로 발현되기 때문에 이를 확인하기 위해 먼저 full transcript를 RT-PCR로 증폭한 후 이것을 reaction mixture로 nested PCR을 수행하였다. 사용된 primer는 다음과 같다; OsEx1'F(5'-GGAGGTTCCACCCGTACC-3'), Oligo-dT, OsEx1F(5'-CGGC-GGAGGCTACAGAAG-3'), OsIn3R(5'-TCGTGAAATTCGACTCCACA-3'), OsIn3F(5'-CATGAATGTTGCTGGCAGTT-3'), OsUR(5'-TTCCGAGTAA-CAGCTTACCAATTT-3'). PCR 조건은 다음과 같다; 94°C, 5 min; 30cycles of 94°C, 30sec/55°C, 30sec/72°C, 2min; 72°C, 7min. PCR 수행후 1% agarose gel에서 확인을 하였다. 또한, 애기장대의 경우 Northern hybridization을 수행하면 두개의 transcript( $\beta$ 와  $\nu$ )가 관찰되는데 벼의 경우에서도 두 개의 transcript가 관찰되는지를 확인하고, 이를 벼 FCA 유전자의 서로 다른 부분을 탐침으로 해서 두 개의 transcript가 서로 다른 transcript인지 여부를 확인하였다. Total RNA(30 ug)를 1.2% agarose/2.2M formaldehyde gel에서 전기영동 하고, 10\*SSC에서 1시간 이상 처리를 한후 capillary 방법으로 nylon membrane에 전이를 시켰다. 완성된 blot은 UV로 고정시키고 60°C에서 6\*SSC, 5\*Denhardt's solution, 0.5% SDS, 100ug/ml salmon sperm DNA에서 17-20시간 혼성화 반응을 시켰다. 그 후에 적당한 SSC solution으로 washing을 수행한 후 IP plate로 expose한 후 Phosphorimager로 확인을 하였다.



## 2) Wild-type 벼 조직 특이적 및 발생시기별 FCA 발현분석

벼의 여러 조직과 발생시기별로 sample을 채취한 뒤 이를 액체질소에서 고운 가루로 마쇄하였다. 이를 TRI reagent를 섞은 후 상온에서 5분간 반응시킨 후 여기에 chloroform을 처리한 뒤 잘 섞어주었다. 이 용액을 원심분리 후 상등액을 isopropanol과 섞은 후 상온에서 10분간 나두었다. 이를 다시 원심분리 후 75% 에탄올을 처리하여 pellet을 닦아주었다. Pellet을 잘 말린 후 이를 DEPC-water에 녹였다. 이 total RNA(30ug)을 formaldehyde gel에서 전기영동을 수행하고, 이를 nylon막으로 전이시키고, 전이된 nylon막을 수용성 혼성화 용액에서 특이적 탐침과 하루정도 반응시킨 후 이를 IP plate에서 노출시킨다. 노출된 IP plate는 Phosphoimager로 분석하였다.

### 나. 애기장대 FCA와 벼 FCA의 기능 비교분석

벼의 전체 FCA cDNA를 sense 방향으로 해서 cauliflower mosaic virus(CaMV) 35S promoter와 Nos terminator 사이에 삽입시킨 후, 이 construct [35S promoter-벼 FCA(sense)-Nos terminator]를 binary vector인 pCAMBIA vector에 넣어 완전한 construct를 만들었다. 애기장대로의 형질전환은 Bechtold (1993)에 의해 개발된 Vacuum Infiltration Method를 사용하였다. 과중한 애기장대 fca-1 mutant를 장일조건에서 꽃이 필 때까지 키우고, 1차 꽃대에서 꽃이 핀 후 잘라주고 4~5일 지나면 여러개의 2차 꽃대가 생기는데 이때에 Agrobacterium을 처리하였다. Vacuum chamber속에 Agrobacteria 용액이 있는 beaker를 넣고, 식물체가 bacteria solution에 잠기도록 pot을 거꾸로 하여 beaker에 넣고, chamber 뚜껑을 닫은 후 5-10분간 vacuum 처리를 하였다. 이렇게 처리된 애기장대에서 완전히 익은 종자 (T1세대)를 받아서 적당한 항생제가 들어있는 MS 혹은 B5 배지에서 형질전환체를 선별하여 토양으로 옮겼다. 애기장대 fca-1 mutant의 개화시기는 잎의 수를 세워 측정하였다.

OsFCA 유전자로 들어가 정상적인 개체로 돌아간 여러 애기장대 line들에서 여러 애기장대 개화시기 조절 유전자들의 발현양상을 semiquantitative RT-PCR을 수행하여 분석하였다. 사용된 여러 개체들에서 total RNA를 분리

한 후 cDNA를 합성하여 PCR에 사용하였다. Total RNA 분리방법과 cDNA 합성방법은 앞서 기술한 것과 동일하다. 사용된 PCR 조건은 다음과 같다; 94 °C (5 min); 25 cycles of 94°C (30 sec)/ 52-60°C (30 sec)/ 72°C (2 min); 72 °C (7min). 사용된 RT-PCR primer는 다음과 같다: OsFCA, 5'-GGAGGTTCCACCCGTACC-3' 과 5'-GGTTGTGAAGAGCTCTGAT-GG-3'; FCA, 5'-CACCTCCTGTTGACTTGGT-3' 과 5'-GCTGAGAGGT-AGGCAACGG-3'; FLC, 5'-GCAAGCTTGTGGGATCAAAT-3' 과 5'-TA-AACCGCCGATTTAAGGT-3'; AGL20, 5'-ATATGGTGAGGGGCAAAAC-TC-3' 과 5'-TCACTTTCTTGAAGAACAAGG-3';  $\beta$ -tubulin, 5'-CTCAA-GAGGTTCTCAGCAGTA-3' 과 5'-TCACCTTCTTCATCCGCAGTT-3'; AP-1, 5'-GCACATCCGCACTAGAAAAACCAAC-3'과 5'-GCATGCTT-TCTAAACAGATCAAGG-3'.

#### 다. 벼 FCA 형질전환체에서 타 개화시기 관련 유전자의 발현조사

OsFCA 유전자로 과다발현시킨 벼 형질전환체에서 OsFCA 보다 아래에 있다고 믿어지는 벼에서 밝혀진 개화시기 조절 유전자들의 발현양상을 Northern hybridization이나 semiquantitative RT-PCR을 통해 확인하였다. 사용된 방법들은 앞서 기술한 것과 동일하였다.

#### 라. 벼에서 애기장대의 다른 개화시기 조절 유전자 확보

1) 애기장대의 개화시기조절 유전자의 벼 homolog에 대한 데이터베이스 검색

Syngenta사(La Jolla, CA)가 Myriad Genetics사와 공동으로 벼의 genome map을 다 밝혀냈다는 보고가 2001년 초에 있었으며, Monsanto사의 데이터베이스에서 벼 전체 genome 염기서열의 약 60%정도를 검색해 볼 수 있었다. 또한, 최근에 중국그룹에 의해 벼 indica 품종의 전체 염기서열이 NCBI database에 존재하기 때문에 이 database도 활용하였다. 애기장대에서

개화시기 조절 유전자들의 아미노산 서열을 가지고 Monsanto사의 데이터베이스를 검색하여 상동성이 높은 유전자들을 찾아보았다.

## 2) 개화시기 조절 유전자들에 대한 full-length cDNA 확보

개화시기 조절 유전자들의 cDNA clone은 RT-PCR을 통해 확보하였다. RT-PCR시 사용하는 cDNA template는 애기장대에서의 개화시기 조절 유전자들의 발현양상을 볼 때 (seedling이나 잎같은 영양 생장기관이나 inflorescence meristem 같은 생식 생장기관)에서 발현이 되므로, 벼의 영양생장기관(seedling, 잎, 줄기)과 생식생장기관(inflorescence meristem, flower)에서 TRI reagent 용액을 이용하여 total RNA를 추출하였으며, cDNA 합성은 앞서 기술한 방법과 동일하게 준비되었다.

벼 database를 통해 선발된 clone은 Co-like 유전자와 FDRMADS8 유전자이다. CO-like 유전자는 GenBank에 등록된 zinc finger protein의 cDNA 유전자(GenBank 등록번호 : AB001887, 1361bp)의 DNA 염기서열로부터 primer(primer1 : 5'-ATTGACGTCTTCG CACAGGC-3', 20mer, cDNA 시작부위, primer2 : 5'-TTTGATTGTCTTCCAGGCG T-3', 20mer, cDNA 염기서열 번호 1051)를 합성하여 이 primer를 이용하여 일품벼에서 분리한 total RNA로부터 RT-PCR로 증폭한 후 pGEM-T Easy vector(그림 2)에 클로닝한 후에 vector의 primer를 이용하여 DNA의 염기서열을 결정하였다. 또한, FDRMADS8의 경우(GenBank 등록번호 : AF141965, 1406bp)는 MADS box 유전자로 5'-GAGAGAGATCGGGATCGATGGTG-3'과 5'-CTGGCCT-TCTTCAACCTGTCTC-3'을 사용하여 일품벼에서 분리한 total RNA로부터 RT-PCR로 증폭한 후 pGEM-T Easy vector(그림 2)에 클로닝한 후에 vector의 primer를 이용하여 DNA의 염기서열을 결정하였다.

## 3) 개화시기 조절유전자들에 대한 발현양상 분석

애기장대에서 개화시기 조절 유전자의 발현연구에 따르면 정도에 차이는 있으나, 식물체의 잎이나 뿌리와 같은 영양 생장기관과 꽃과 같은 생식

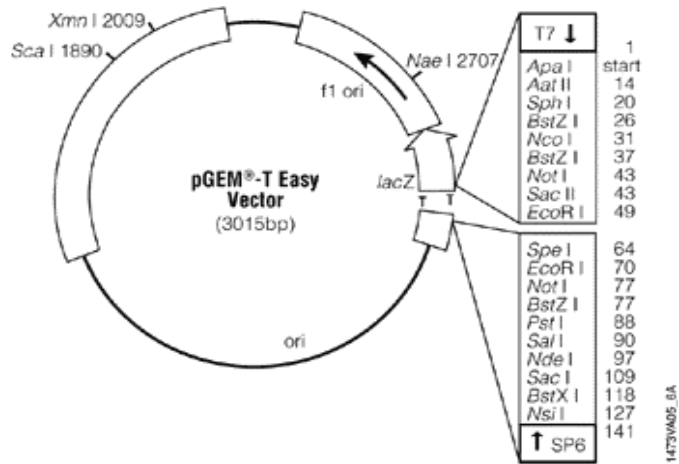


그림 2. pGEM-T Easy vector의 모양

기관에서도 발현되는 것을 볼 수 있다. 따라서, 우선적으로 개화시기 조절 유전자들의 발현양상을 조사하기 위해 벼의 부위별로 채취한 조직에서 분리해낸 RNA를 이용해서 Northern 분석이나 semiquantitative RT-PCR 분석을 수행하였다.

#### 4) 개화시기조절 유전자에 대한 벼형질전환체 생산

벼의 FDRMADS8의 cDNA를 pBluescript에 cloning 되었던 플라스미드로부터 PCR을 수행 하여 30mer attB adapter를 붙여주었으며 invtrogen사의 Gateway™ Technology를 이용하여 pDONR 201 vector를 거쳐 pSB11(pMJC-GB) vector에 삽입한 후 Tri parental mating 방법으로 식물형질전환용 vector pSB1에 삽입하여 식물발현 vector pSB111를 만들었다. 이것을 Agrobacterium에 형질전환한 후 rice의 embryo로부터 induction된 callus에 infection하여 형질전환하였다. FDRMADS8를 과다 발현시키기 위해 Cytochrom C promoter를 사용하였으며 selection marker로는 phosphinothricin acetyl transferase gene(bar)를 사용하였다.

벼의 형질전환체 생산은 다음과 같다. 우선 낙동벼의 종자를 70% ethanol, 50% ROX(유한락스원액 : 3차 살균증류수 = 1:1), 그리고 3차 살균증류수로 깨끗이 소독한 후, callus 유기배지인 2N6 배지에 암 상태에서 약 1달간 28℃에서 향온 배양하여 callus를 유기 시켰다. 이때 유기된 callus를 Agrobacterium과 co-cultivation을 하였다. Cocultivation 과정은 callus 유기배지에서 5일정도 자란 embryogenic callus에 OD600 값이 1.5-2.0가 되는 Agrobacterium에 acetosyringone(AS)을 20ppm 되게 넣고 15분간 감염시켰다. 그 후 acetosyringone이 들어있는 2N6-AS 배지에 옮기고 암상태에서 3일간 25℃에서 향온배양하였다. 3일 후 이를 cefotaxime(250ppm)이 들어있는 살균증류수로 씻어주고 phosphinothricin (selection marker)이 포함된 2N6-CP(cefotaxime 250ppm, phosphinothricin 6ppm) 배지로 옮긴 후 한 달간 28℃에서 향온배양하고, 형질전환된 callus를 재분화배지에 넣어 재분화를 유도하였다. 재분화가 된 개체는 논흙으로 옮겨 계속해서 생장을 시켰다.

## 2. 벼 FCA의 유전자 분리 및 FCA의 형질전환체 생산

### 가. 벼 FCA cDNA와 genomic DNA의 분리 및 완전염기서열

벼 FCA genomic clone은 확보된 FCA full-length cDNA를 탐침으로 하여 미국 Clemson university에서 구축한 벼 품종 Nipponbare의 BAC library의 BAC filter를 이용하여 FCA genomicDNA를 함유하고 있을 것으로 추정되는 BAC clone들을 선발하였다. 확보된 positive clone의 DNA를 분리하여 HindIII로 처리한 후 전기영동을 통해 삽입 유전자를 Southern 분석을 하여 전체 FCA 유전자를 포함할 것으로 추정되는 DNA 단편을 분리하여 염기서열을 결정하였다.

### 나. 벼 FCA 유전자의 분자유전자지도 작성

FCA유전자의 염색체 상의 위치를 분석하기 위해 164 계통으로 구성된 MG RI 집단(밀양23/기호벼 재조합 자식 계통)을 이용하였다. DNA의 추출은 Shure et al.(1983)과 Tai et al.(1990)의 방법을 절충하여 이용하였으며 DNA의 제한효소처리, Southern blotting 및 hybridization은 McCouch et al.(1988) 방법에 의하여 수행하였다. DNA probe로 사용하기 위해 FCA 유전자의 DNA는 random hexamer 방법으로 방사능 표지를 하였다. 164계통의 MG RI 집단으로부터 RFLP 방법에 의해 얻은 자료는 Macintosh Power PC 8100/80AV에서 Mapmaker Version 2.0(Lander et al. 1987)을 이용하여 연관분석을 하였다.

### 다. 벼에서의 CO-like 유전자와 *Hdl* 유전자의 분리

벼 *Hdl* 유전자 (GenBank 등록번호 : AB041837, 4801bp)는 애기장대의 CONSTANS 유전자와 유사한 유전자로서 일본 국립농업생물학연구소에 근무하는 Masahiro Yano 박사로부터 벼의 *Hdl* (CONSTANS) 유전자를 함유하는 *Apal*으로 처리된 genomic DNA (7.1kb) 단편이 삽입된 plasmid pPZPHd1 (그림3)를 분양받았다. 이 plasmid를 이용하여 *Hdl* 유전자를 cloning하였다.

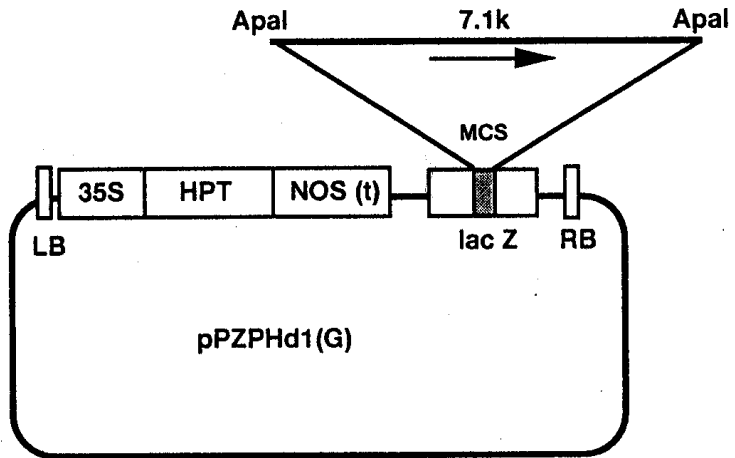


그림3. *Apal*으로 절단한 *Hdl* genomic DNA이 삽입된 pPZPHd1 plasmid.

라. 벼 FCA cDNA, CO-like cDNA 및 *Hdl* genomic DNA 유전자의 형질전환 벡터 구축

벼 FCA cDNA는 전체 2521bp로 구성되어 있으며 738개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하는 유전자이다. pBluescript 플라스미드에 삽입되어 있는 벼의 FCA cDNA를 절단해 내어 pUC plasmid에 35S promoter와 nos terminator가 삽입된 플라스미드에 삽입하고 이것을 다시 식물형질전환 vector pCAMBIA3300에 construct를 하였다.

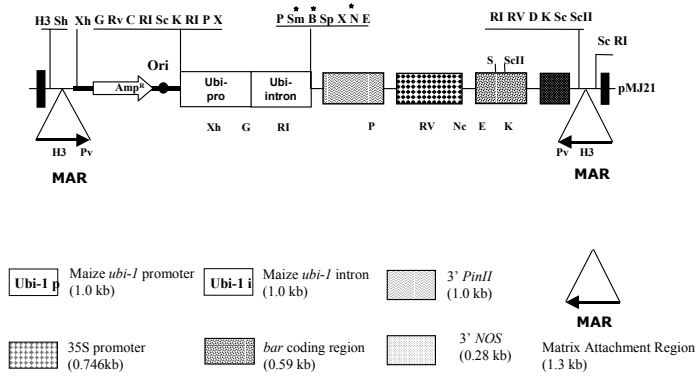
CO-like 유전자의 구조유전자를 PCR로 증폭하기 위하여 CO-like 유전자는 pGEM-T Easy vector에 cloning 되어있는 유전자의 시작 코돈과 종결코돈에서 primer를 제작하여 PCR로 증폭한후 pGEM-Teasy vector에 클로닝하였다. 삽입단편을 염기서열분석으로 확인한 후 제한효소 *NotI*을 사용하여 구조유전자부위를 절단하여 binary vector인 pMJU plasmid (그림 4)의 *NotI* 위치에 ligation한 후 대장균 DH5a에 transformation 하였다.

pMJU-CO plasmid를 대장균에 삽입한 후 항생제 스펙티노마이신이 33 ug/L로 함유된 LB agar 배지에서 선발된 colony를 액체배양 하여 plasmid DNA를 분리하고 제한효소 *NotI*으로 삽입단편을 확인하였다. 염기서열분석과 제한효소처리로 삽입된 유전자의 방향성을 확인하였다. CO-like 유전자가 클로닝된 binary vector (pMJU-CO)는 triparental mating 방법으로 *Agrobacterium* LBA4404에 도입하였고 항생제 선발배지에서 도입여부를 확인하였다. PCR 및 염기서열분석으로 구축된 벡터를 확인하였다

*Hdl* 유전자의 형질전환벡터 구축은 위에서 언급한 CO-like 유전자와 동일한 방법으로 작성하였다. *Hdl* 유전자는 pZPHd1 plasmid에서의 *Hdl* 유전자의 ORF의 시작부위에서의 Hd1up primer (5'-ATGAATTATAATTTTG-GTGG)와 종결코돈에서의 Hd1dn primer (5'-TCAGAACCATGGAACAGT)를 이용하여 hd1 genomic DNA 단편을 갖고있는 pZPHd1(G)를 template DNA로 사용하여 PCR로 증폭하였다. 증폭된 단편을 1 % agarose gel 상에서 분석하였고 pGEM-Teasy vector에 클로닝하였다. 먼저 ORF부분을 PCR로 증폭하여 pGEM-Teasy 벡터에 클로닝한 후 *NotI* 제한효소로 삽입단편을 분리하여 pMJU vector에 클로닝하였다. *Hdl* 유전자가 클로닝된 벡터(pMJU-Hd1)



pMJ-U



벡터size(pMJ21) = 14kb  
 Ubi (promoter+intron)= 2kb  
 total : 16kb

그림4. pMJU 벡터의 모습.

를 triparental mating 방법으로 *Agrobacterium* LBA4404에 도입하였다.

#### 마. 벼 형질전환

FCA의 경우 FCA의 cDNA가 삽입된 pB2PFT 벡터를 다시 *agrobacterium*에 형질전환 시킨후 낙동 벼 callus에 형질전환하였다. 본 실험에서 수행한 벼 형질전환체 생산에 대한 자세한 추진 체계는 그림 5에서 도표화하였다. 우선 낙동벼의 종자를 70% ethanol, 50% ROX (유한락스원액 : 3차 살균증류수 = 1:1), 그리고 3차 살균증류수로 깨끗이 소독한 후, callus 유기배지인 2N6 배지에 암상태에서 약 1달간 28℃에서 향온 배양하여 callus를 유기시켰다. 이때 유기된 callus를 *Agrobacterium*과 co-cultivation을 하였다. Cocultivation 과정은 callus 유기배지에서 5일정도 자란 embryogenic callus에 OD600 값이 1.5-2.0가 되는 *Agrobacterium*에 acetosyringone(AS)을 20ppm 되게 넣고 15분간 감염시켰다. 그 후 acetosyringone이 들어있는 2N6-AS 배지에 옮기고 암상태에서 5일간 25℃에서 향온배양하였다. 5일 후 이를 cefotaxime(250ppm)이 들어있는 살균증류수로 씻어주고 phosphinothricin (selection marker)이 포함된 2N6-CP (cefotaxime 250ppm, phosphinothricin 6ppm) 배지로 옮긴 후 한 달간 28℃에서 향온배양하고, 형질전환된 callus를 재분화배지에 넣어 재분화를 유도하였다. 재분화된 식물체는 배양실에서 1주일간 순화시킨후 온실로 옮겨 심었다. 종자에서 callus 유도 및 형질전환체의 종자를 수확하기까지는 약 6개월이 소요되었다.

CO-like 유전자와 *Hdl* 유전자는 다음과 같이 형질전환을 실시하였다. 벼 callus 유기 및 증식의 경우는 벼 종자의 살균은 껍질을 벗긴 낙동벼 종자를 70 % 에탄올에서 5분간 표면살균 후 2 % 락스 (유한락스, 4 % 유효염소함유) 용액에서 15분씩 2번 살균한 다음 멸균수로 5분씩 5회 반복하여 실시하였다. 살균된 종자는 2 mg/L 농도의 2,4-D가 함유된 2N6 배지에 치상하여 26℃에서 약 4주간 암 배양하여 callus를 증식하였다. callus가 유기된 후 즉 4주간 암 배양하여 증식된 callus중 생육이 좋은 embryogenic callus를 선발하여 2N6 배지에서 2일간 배양하여 준비하였다. 형질전환벡터를 함유한 *agrobacterium* 균은 항생제가 포함된 AB agar 배지에서 2일간 배양 후 AAM 액체배지 (100

uM acetosyringone 함유)에 희석하여 1.5 - 2.0 OD가 되도록 조절하였다. 약 500개의 선발된 embryogenic calli와 25 ml 정도의 agrobacterium 현탁액을 petri dish에 혼합하여 25°C에서 15분간 배양한 후 여분의 균 배양액을 제거하고 2N6-acetosyringine (250 mg/L) 배지에 치상하여 2 일간 co-culture 하였다. Co-culture 후 250 mg/L 농도의 cefotaxime이 함유된 멸균수로 calli 표면에 자란 Agrobacterium 세척하고 2N6-CP 선발배지 (250 mg/L cefotaxime, 2.5 mg/L PPT)에 치상하여 암 배양하였다.

2N6-CP 배지에서 3주간의 선발과정을 거친 callus를 새로운 2N6-CP 배지에 계대하여 3주간 배양하였고 식물체의 재분화는 MSR-CP 배지(250 mg/L cefotaxime, 2.5 mg/L PPT)에서 유도하였다. 재분화된 형질전환체는 MS0-PPT (2.5 mg/L PPT) 배지에서 순화시킨 후 온실에서 증식하였다.

#### 바. FCA, CO-like 및 *Hdl* 형질전환체의 분석

FCA, CO-like 유전자 및 *Hdl* 유전자의 형질전환체의 분석을 실시하였다. 전환체의 Basta 처리 반응, PCR을 통한 유전자의 삽입 여부 조사, Southern hybridization을 통한 copy수 조사 등을 통하여 전환체의 특성을 조사하였다.

FCA 형질전환체의 경우 FCA cDNA가 염색체에 삽입되었나를 확인하기 위하여 PCR을 수행하였다. PCR primer는 exon9번에서 시작하는 primer-8 (forward primer, 5'-CGGTTC GCT GAT CCT AAG AG-3', genomic DNA 경우 뉴클오티드 6099번에서 시작하며 cDNA 경우는 뉴클오티드 909번에서 시작함)과 엑손 13번에서 시작하는 primer-8-1(reverse primer, 5'-GCT GAC CAA TCT GTT GAG CAG-3', genomic DNA 경우 뉴클오티드 7335번에서 끝나고 cDNA 경우는 뉴클오티드 1407번에서 끝남)를 설계하였다. 이 두 개를 primer를 사용하여 PCR을 할 경우 정상적인 낙동벼에 존재하는 FCA 유전자 경우는 1237bp 크기의 DNA 단편이 증폭되고 삽입된 FCA cDNA 경우는 499bp 크기의 단편이 증폭되게 된다.

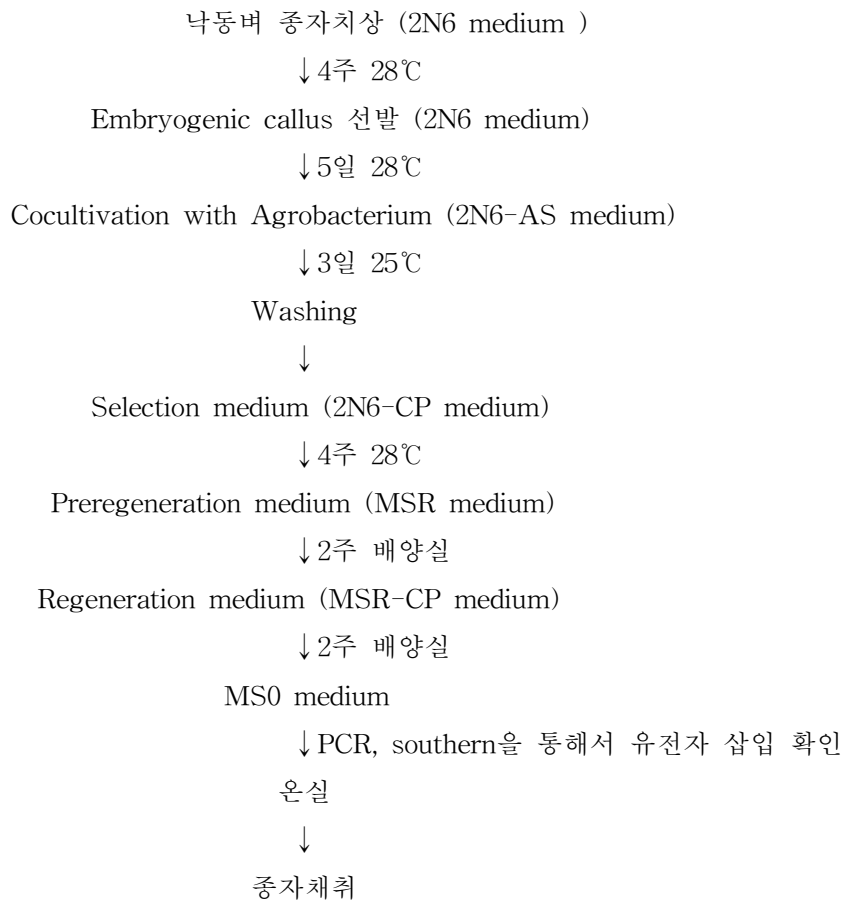


그림 5. 벼 형질전환 추진체계 모식도.

## 제 2 절 연구내용

### 1. 벼 개화시기조절 유전자 FCA의 기능 및 특성 규명

#### 가. 벼 FCA 유전자의 조직 특이적 및 발생시기별 발현 양상 분석

##### 1) 벼 FCA 유전자의 alternatively-spliced transcript 유무 확인

Full-length FCA cDNA clone이 확보되면 애기장대의 경우에서처럼 벼 FCA transcript도 alternatively-spliced transcript를 만드는지 조사하려 한다. 조사방법은 Northern hybridization과 RT-PCR 방법을 병행하여 취하도록 할 것이다. 연구결과는 쌍자엽식물인 애기장대와 단자엽식물인 벼간의 좋은 비교가 될 것으로 생각된다.

##### 2) Wild-type의 벼 조직 특이적 및 발생 시기별 FCA 발현 분석

Northern 분석 - 애기장대의 FCA 발현연구에 따르면 식물체의 잎과 뿌리와 같은 영양생장기관과 생식생장기관에서 모두 발현되는 것을 볼 수 있다. 벼에서 분리된 FCA도 애기장대와 같은 발현양상을 보이는지 조사할 것이다.

#### 나. 애기장대 FCA와 벼 FCA의 기능 비교 분석

확보된 벼 FCA cDNA clone이 애기장대 FCA의 functional homolog인지를 조사하기 위하여 애기장대 *fca-1* mutant에 벼 FCA cDNA를 발현시킨다. 벼 FCA cDNA로 형질전환된 애기장대 *fca-1* mutant가 wild type 표현형, 즉 정상적인 개화시기를 갖게 되는지를 조사한다. 그리고, 형질전환된 애기장대의 *fca-1* mutant나 wild-type에서 벼 FCA homolog가 다른 개화시기조절 유전자에 어떻게 작용하는지를 비교해 볼 것이다.

#### 다. 벼 FCA 형질전환체에서 타 개화시기 유전자의 발현 조사

FCA 유전자가 과다 발현 또는 antisense bloking이 되는 형질전환체의 형질에 따라 달라질 수 있겠지만 만일 형질전환체가 wild-type과 달리 개화시기가 앞당겨지는 형질을 보여줄 경우, 다른 개화시기 관련 유전자들 즉, Hd-1 유전자나 애기장대 FT유전자의 homolog로 생각되는 벼의 Hd3a 유전자의 발현양상의 변화를 조사함으로써 이들 유전자들간의 상호 관계를 추정해본다.

#### 라. 벼에서 애기장대의 다른 개화시기 조절 유전자 확보

##### 1) 애기장대의 개화시기조절 유전자의 벼 homolog에 대한 데이터베이스 검색

Syngenta사(La Jolla, CA)가 Myriad Genetics사와 공동으로 벼의 genome map을 다 밝혀냈다는 보고가 2001년 초에 있었으며, Monsanto사의 데이터베이스에서 벼 전체 genome 염기서열의 약 60%정도를 검색해 볼 수 있다. 애기장대에서 개화시기 조절 유전자들의 아미노산 서열을 가지고 Monsanto사의 데이터베이스를 검색하여 상동성이 높은 유전자들을 찾아본다.

##### 2) 개화시기 조절 유전자들에 대한 full-length cDNA 확보

개화시기 조절 유전자들에 대한 full-length cDNA 확보하고, 이를 기존에 알려진 애기장대의 유전자들과 비교하여 homology가 어느 정도인지 분석한다. 또한, 벼의 유전체에서 이 유전자들이 family로 존재하는지 여부도 조사한다.

##### 3) 개화시기 조절유전자들에 대한 기능분석

앞서 기술한 FCA의 경우처럼 Northern 분석이나 semi-quantitative RT-PCR을 통해 조직 및 발생시기별 발현양상을 조사한다. 그리고, 이들의 발현 양상

이 애기장대와 유사한지 여부를 조사해본다.

#### 4) 개화시기조절 유전자에 대한 벼형질전환체 생산

FCA 벼 형질전환체에서와 마찬가지로 출수기의 변화여부와 다른 유전자들간의 관계를 추정해본다.

## 2. 벼 FCA의 유전자 분리 및 FCA의 형질전환체 생산

### 가. 벼 FCA 유전자의 genomic clone 확보 및 특성규명

FCA genomic clone은 BAC library filter를 확보된 FCA cDNA clone을 probe로 이용하여 screening하고 positive clone들을 확보하여 CHEF gel에서 분석하여 전체 FCA 유전자를 포함할 것으로 추정되는 clone들을 선별하여 DNA sequencing을 수행한다. 완전한 길이의 FCA gene의 염기서열을 결정하여 벼 FCA 유전자와 애기장대의 FCA 유전자간의 염기서열의 상동성 정도를 측정하여 두 식물체간의 분자생물학적 연계성을 진단할 것이며 아울러 벼 FCA 유전자가 합성하는 아미노산의 특성을 포함한 전체적인 유전자의 구조를 파악하게 된다. 또한, 분리된 genomic clone의 염기서열 역시 완전히 분석하여 promoter 부분과 intron등 벼 FCA 유전자의 구조를 애기장대의 clone과 비교 분석한다.

### 나. 벼 FCA의 분자유전자 지도상의 위치 결정

벼의 경우는 협동연구기관인 농업 과학기술원에서 다년간의 연구를 통해 chromosome상의 RFLP marker에 대해 saturated map이 완성되어 있는 상태이기 때문에 FCA와 가깝게 연관되어 있는 RFLP marker등을 확인하여 염색체상의 위치를 결정함으로써 육종에 도입/활용할 수 있도록 한다.

### 다. 벼 FCA 형질전환체 생산을 통한 조기 개화가능성 타진

35S promoter-FCA-Nos terminator construct를 selection marker인 phosphinothricin acetyl transferase gene (bar)과 matrix attachment region gene (mar)을 가진 binary vector인 pMJ-U에 삽입시켜 형질전환 vector를 제조한다.

벼로의 형질전환은 벼의 종자를 70% ethanol, 20% Clorax로 소독 후, 배양하여 callus를 유기 시킨다. 유기된 callus를 Agrobacterium과 co-cultivation을 한 후 형질전환된 callus를 골라 phosphinothricin (selection marker)이 포함된 regeneration medium에서 키운다. 유기된 식물체를 shoot와 root를 신장시킨 후 이 개체를 토양 상태로 옮긴다. 형질 전환된 T1 세대를 찾아서 표현형을 관찰한다.

라. 벼 CO-like 및 *Hdl* 전환체의 생산

앞서 기술한 벼 FCA 형질전환체 생산과 동일하다.

## 제 3절 연구결과

### 1. 벼 개화시기조절 유전자 FCA의 기능 및 특성 규명 (주관과제)

#### 가. 벼 개화시기조절유전자 FCA cDNA 확보 및 특성 규명

벼의 seedling상태에서 만들어진 cDNA library를 애기장대 FCA의 WW domain과 상동성을 보이는 EST (accession # C74748) clone을 탐침으로 screening하여 약 2.2kb 크기의 clone을 찾았다. 염기서열을 분석한 결과 이 clone은 전체서열을 가진 것으로 밝혀졌으며, 738개의 아미노산(그림 6)과 애기장대 FCA의 보존적 서열인 두 개의 RNA 결합부위(RRM; RNA recognition motif)와 한 개의 단백질 결합부위 (WW domain)을 가지고 있었다. 이런 RNA 결합 단백질들은 RNA 공정, mRNA운반, mRNA안정성, mRNA번역 등



CT CGT GCT CTC GCA AAA CCC TAG CCC ACC TCC CCC TCC ACC CAC ATG CAC CGC GGC GGC GAC CGC TCC ACC GAC CCC TCC TCC GGC CCC 89  
M H R G G D R S T D P S S G P 15  
GGC CCC GGT TCT CGC GGC GGC GGC GAC GGC CGA TTC GGC CGC GGC CCT TCT CGC TGG TCG TCC GGC GGT GGC GGC GGC GGT AGC GGC AGC 179  
A P G S R G G G D G R F G R G P S R W S S G G G G G G S G S 45  
CCA CCC CAC CGC TTC TCC CGT GGT GGC GGT GGC GGC GGC GGC GAC GGT GGC GGA GGC GGT GGA GGC GGC GGC TTC CAC CCG TAC CGT 269  
P P H R F S R G G G G G G D G G G G G G G G R F H P Y R 75  
GGC CCG TCG GAC CAC TCC GGC GGC GGA AGC TAC AGA AGC GGC GGC GGC GAG TAC GGG GAG CCG GGT AGC GGC CCG AGA CAC CGC TAC 359  
G P S D H S G G G Y R S G G G E Y G E P G S G P R H R Y 105  
GGC AGT GGC CGT GGT GAC CAC TCA GAT CAT GAT AAC AGA AAC AAC TAT GTT AAA CTT TTT ATT GGG TCA AGT TCC AGG ACA GGC ACT GAG 449  
G S G R G D H S D H D N R N N Y V K L F I G S S S R T A T E 135  
GAT GAT GTA CGT CCT TTA TTT GAG GAG CAT GGA GAT GTT GTT GAA GTT GCT TTG ATC AAG GAT AGG AAG ACT GGT GAA CAG CAA GGT TGT 539  
D D V R P L F E E H G D V V E V A L I K D R K T G E Q Q G C 165  
TGT TTT GGT AAA TAT CTT ACT GCT GAA GAG GCT GAG CGA GCC ATC AGA GCT CTT CAC AAC CAG TAC ACT TTA CCT GGG GCA ATG GGC CCT 629  
C F G K Y A T S E E A E R A I R A L H N Q Y T L P G A M G P 195  
ATT CAA GTC AGA TAT GCT GAT GGT GAA AGC GAA CGC CAT GGC GCT ATT GAG CAC AAG CTG TTT GTC GCA TCA CTC AAT AAG CAA GCT ACT 719  
I Q V R Y E A D G R E R E H G A I E H K L F V A S L N K Q A T 225  
GGC AAG GAG AAT GAA GAG ATT TTT GCG CCG TAT GGT CAT GTG GAA GAT GTC TAC ATT ATG AAA GAT GGC ATG AGG CAG AGC CGA GGT TGT 809  
A K E I E E I F A P Y G H V E D V Y I M K D G M R Q S R G C 255  
GGC TTT GTC AAA TTC TCA TCA CGA GAA CGC GCT CTT GCA GAC ATG ACT GCT CTG AGT GGG AAT TAT GTA ATG AGG GGC TGC GAG CAA CCA 899  
G F V K F P S S R P A L A D M T A L S G N Y V M R G C E Q P 285  
TTA ATA ATT CGG TTC GCT AAT CCT AAG AGA CCT AGA GCT GGA GAA TCA AGG GGT GGT CCT GCA TTT GGA GGT CCT GGT TTC AGT CCA CGA 989  
L I I R F A D P K R P R P G E S R G G P A F G G P G F S P R 315  
TCT GAT GCA GCT CTT GTT ATC AGG CCG AGC GCC AAC CTT GAT GAA CCA AGG GGT GGC CAT ATG CCT CCT GAC TCT TGG CAT CCA TCA AGC 1079  
S D A A L V I R P T A N L D E P R G R H M P P D S W H P S S 345  
CCA AGG TCA GCA CCT CAT CAG TTT AAT AAC TTT GGA TCT GAC AAT CCT ATG GCT CCG AAA GGG AGT ACT GTT ACA TCA ACA GAT AGG 1169  
P R S A P H Q F N N F G S D N P M A P K G S T V T S T T D T 375  
GCC ACT TTT CGA CCT CAG ATG TTC AGC GAA AAT GGC TCT TTG TCA AGC CAA ACA GCT GTG CCA AGT TCG TCA CAT ATG GGC ATG AAC CCT 1259  
A T F R P Q M F S G N G S L S S Q T A V P S S S H M G M N P 405  
CCT CCC ATG GCA CAA GGC CAT CTG GGA GGC CAG CAG ATC CCA CCT TTG CAA AAG CTA CCA GGG TTG CCT CAG AAT TTC CCT GTT CAA 1349  
P P M A Q G H H L G G Q Q I P P L Q K L P G L P Q N F P V Q 435  
TTG CAG AAT AAT CAG CTG GGA CAA CCC TTG CAG GGT CCT GCT CAA CAG ATT GGT CAG CTT CAA GTT CCA CAA TCT ATG GGT CCT GGT TCT 1439  
L Q N N Q L G Q P A Q Q I G Q L Q V P Q S M G P G S 465  
TTT GGC CAG AAT AGG TTA TCT GGT CAG CTT CCT GTG TCA CAG CCG TTG ATG CAA CAA AAT GCT TCC GTC AGC GCT GTG CAG GTG CCT TCA 1529  
F G Q N R L S G Q L P V S Q P L M Q Q N A S V S A V Q V P S 495  
GCC GTG TCC AAT TCC ATG CAA GCT ATT CCC GGG CAA CAG CAT CTT CCC TCA AAT GTT GCA CCA CAA ATG CTT CAG CAG CCA GTG CAG CAG 1619  
A V S N S M Q A I P G Q Q H L P S N V A P Q M L Q Q P V Q Q 525  
ATG CCA TCG CAA GCA CCA CAA TTG CTA CTT CAA CAG CAA GCT GCT TTG CAA TCC AGT TAT CAA TCT TCA CAG CAG GCA ATT TAT CAG CTT 1709  
M P S Q A P Q L L L Q Q Q A A L Q S S Y Q S S Q Q A I Y Q L 555  
CAA CAA CAG CTG CAA CTA ATG CAG CAG CAG CAA TCG AAT CTA AAC CAT CAA CAA CCC ACA CAG GGT CAG CCA GTG CAA TCT AGT AAC 1799  
Q Q Q L Q L M Q Q Q Q S N L N H Q Q P T Q G Q P V Q S S N 585  
CCT GGT GCC CCA AAT GCC ATT ATT CCA TCA AAC ATT AAT ACA ATT CCC CAG CAG GCT ACT TCA CCT GCA GTT CCT TTA ACC TGC AAT TGG 1889  
P G A P N A I I P S N I N T I P Q Q A T S P A V P L T C N W 615  
ACT GAA CAT ACG TCT CCT GAA GGT TTT AAA TAC TAC TAC AAT AGC ATA ACT CGA GAG AGT AAG TGG GAT AAG CCT GAA GAG TAT GTG CTG 1979  
T E H T S P E G F K Y Y N S I T R E S K W D K P E E Y V L 645  
TAT GAG CAA CAG CAA CAG CAG CAA CAG CAG AAA CTA CTT TTG CTT CAA CAG CAC CAA CAA AAA CTT GCC ATG CAG CAA CTT CAG TCA 2069  
Y E Q Q Q Q Q Q Q Q K L L L L Q Q H Q Q K L A M Q Q L Q S 675  
CCA CCT GAG CAG ACA CAT CCA GCA ATG CAA CCT GTC CAA CAA ATT CTT CAG GCA CAA CAA GGA CAG CAA CAA ATG CAG ATG AAA CAG 2159  
P P Q A Q T H P A M Q P V Q Q I P Q A Q Q G Q Q Q M Q M K Q 705  
CAG GAA TTG AAT TAT ACT CAG CTA CAG ACT CCT GGT GCT ATT GAT CCC AGT AGG ATA CAA CAG GGC ATC CAA TCT GCA CAA GAA CGT GCT 2249  
Q E L N Y T Q L Q T P G A I D P S R I Q Q G I Q S A Q E R A 735  
TGG AAA AGT TGA GAC TGA AGG TGA ATG ATA AAT TGG TAA GCT GTT ACT CCG AAA TGA GCT CCA CTC AAC CTG CTG CCT CCA TCA AAT GCC 2339  
W K S \* 739  
TTG ACG GTG CCT GAT GCC TGA GTG GTG GCC AAG CGG CCA TGC CGA TCG TTG TAA CTC TGG ATA TAG CTT AGA TTG ATG TCT AAA AAG TTG 2429  
TAG CTC CAA TCC GTG TAA AAT GTT TGC AGT CTA GGC CTT GTA CCG CTG TAA CAT TTC TGC TGA TTA GAA TGT TCG CTT TCC TTG CAT AAA 2519

AA

2521

그림6. 벼에서 분리한 FCA cDNA의 핵산 염기서열 및 아미노산 서열

의 전사 후 단계에서 관여하는 것으로 알려져 있다 (Siomi and Dreyfuss, 1997). RNA 결합 단백질들은 80-90 아미노산으로 구성된 RRM domain을 가지고 있는데, OsFCA 단백질의 RRM domain은 초파리의 BrunoL-4 단백질의 RRM domain과 가장 유사하였다. 초파리의 Bruno 단백질은 oskar 유전자의 발현 조절과 oogenesis 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다(Webster et al., 1997). 또한, OsFCA 단백질이 가지고 있는 또 하나의 WW domain은 다른 단백질과 상호결합을 하는 것으로 알려져 있다. 최근의 논문들에 따르면, 애기장대 FCA단백질의 WW domain이 또 다른 개화시기의 자발적 경로에 작용하는 FY와 상호작용을 하여 자기 자신의 전사과정을 autoregulation하고, 개화시기 억제자인 FLC에 영향을 주는 것으로 보고가 되었다 (Quesada et al., 2003; Simpson et al., 2003). 벼에서 분리된 FCA와 애기장대 FCA의 전체적인 유사성을 비교하면 38%로 낮지만, 두 개의 보존적 서열에서는 각각 78%와 93%의 높은 유사성을 보였다 (그림 7A). 또한, 애기장대 FCA와 달리 N 말단 부위에 아미노산인 글라이신이 반복적으로 존재하고 있다. 또한, OsFCA 유전자의 구조는 17개의 exon과 16개의 intron으로 구성되어 있으며, 애기장대의 FCA 유전자와 마찬가지로 intron3의 길이(2503bp)가 다른 intron들에 비해 상당히 길었다 (그림 7B). 다른 식물체(Brassica napus와 pea)에서도 intron3의 길이가 다른 intron들에 비해 상당히 길었다 (Macknight et al., 2002). 다른 exon과 intron의 상대적인 길이도 애기장대와 벼간에 상당히 유사하였다.

OsFCA 유전자의 copy수를 알아보기 위해 genomic Southern blot을 수행한 결과 벼의 유전체에서는 한 copy만 존재하는 것으로 보이며(그림 8), 지금까지 밝혀진 벼의 유전체 database를 탐색해 보았을 시에도 한 copy만 존재하였다. 하지만, 다른 단자엽식물(옥수수, 밀, 보리)의 경우에는 여러 copy가 존재하는 것으로 사료된다 (그림9).

#### 나. 벼 개화시기조절유전자 FCA의 alternative splicing pattern 확인

애기장대의 genomic FCA 유전자의 경우 크기는 8.1kb로 여기서 네가지의 spliced transcript(FCA  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ )가 나오는 것으로 알려져 있으며, 이중 한 transcript만(FCA  $\gamma$ )이 개화시기 조절에 있어 기능을 가진 단백질을 만드는



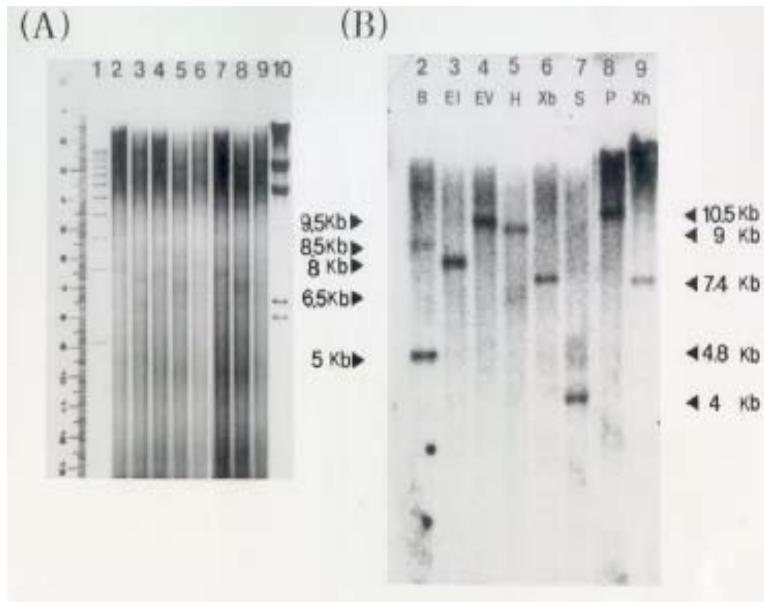


그림 8. 벚 FCA 유전자의 Southern hybridization 결과

A. 벚의 genomic DNA 10 $\mu$ g을 사용하여 제한효소를 처리하였다 (1, 1kd DNA ladder; 2, *Bam*HI; 3, *Eco*RI; 4, *Eco*RV; 5, *Hind*III; 6, *Xba*I; 7, *Spe*I; 8, *Pst*I; 9, *Xho*I)

B. Southern 결과

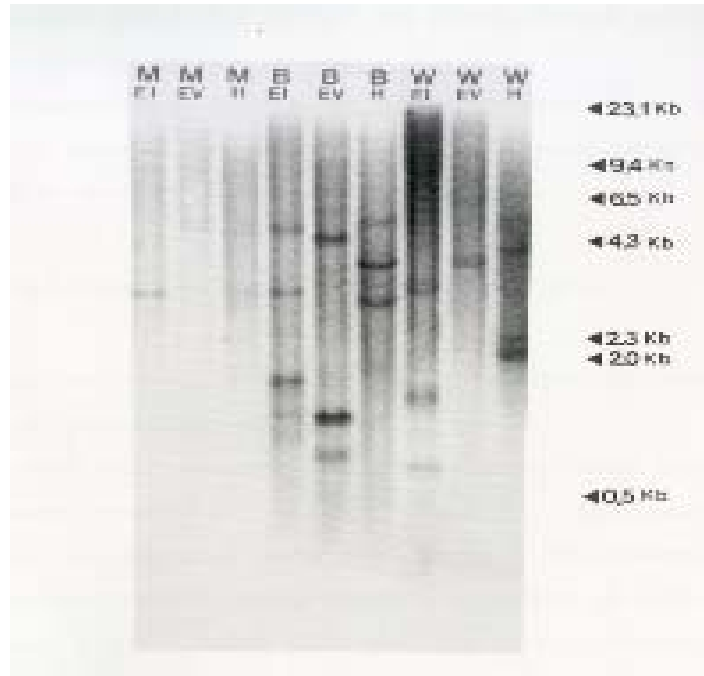


그림 9. 여러 단자엽류에서 FCA 유전자의 Southern hybridization 결과  
 옥수수(M), 보리(B), 밀(W)의 genomic DNA 10 $\mu$ g을 사용하여 제한효소를 처  
 리하였다(EI, *EcoRI*; EV, *EcoRV*; H, *HindIII*)

것으로 알려져 있다 (Macknight et al., 1997). 또한, 애기장대외에 *B. napus*와 *pea*에서도 alternative splicing을 한다는 간접적인 증거도 발표가 되었다 (Macknight et al., 2002). 이러한 alternative splicing은 단백질 활성의 조절, 단백질의 세포내 위치 변화, RNA안정성에 대한 영향, 번역효율 등에 영향을 미친다 (Smith et al., 1989). 그러나, 식물에서 alternative splicing에 대한 중요성과 예는 별로 보고가 된 바가 없다. 이런 사실들에 비추어 단자엽 식물인 벼에서도 이러한 alternative splicing이 일어나는지 여러 실험을 수행해 보았다. 이들 alternatively-spliced transcript는 모두 5'쪽을 공통적으로 가지고 있기 때문에 5'-coding region(exon 1)에서 한 primer (GSP2; gene-specific primer)를 잡아서 adaptor에 있는 primer(AP1 primer)와 함께 3'-RACE-PCR을 수행하였다. 그리고, 3'-RACE-PCR을 수행 후 false positive를 가리기 위해 벼 FCA cDNA clone을 탐침으로 Southern 분석을 하여 alternatively-spliced form을 확인하였다. 예상했던 것과 마찬가지로 벼 FCA 유전자도 애기장대 FCA 유전자처럼 alternatively-splicing pattern을 보였으며, Southern hybridization을 통해서 false positive를 가릴 수 있었다 (그림 10) (벼에서는 약 5개 정도의 alternatively-splicing form을 확인). 이 결과로는 alternatively-splicing pattern을 보인다는 것만 확인할 수 있었다.

3'RACE-PCR을 통해 벼 FCA 유전자의 alternative splicing pattern을 어느 정도 확인 후 Northern blot을 수행하였다. 두 개의 전사체가 확인이 되었으며, 이는 3kb와 1kb의 길이를 가졌다 (그림 11a). 애기장대의 결과를 비추어보면, 3kb는  $\nu$  전사체에 해당되며, 1kb는 intron3를 일부 포함한  $\beta$  전사체에 해당된다. 이것을 입증하기 위해 3kb와 1kb에 특이적으로 결합할 수 있는 탐침을 사용하여 Northern blot을 수행하였다. 그 결과로 3kb 전사체는  $\nu$  특이적인 전사체와 결합하는 탐침에 의해 혼성화되었고(그림 11b), 1kb 전사체는  $\beta$  특이적인 전사체와 결합하는 탐침에 의해 혼성화되었다 (그림 11c).

그리고, OsFCA 유전자의  $\beta$  전사체의 cDNA를 얻기 위해 cDNA library screening을 수행해보았지만, 찾지는 못하였다. 하지만, 벼의 EST database를 탐색해 본 결과 OsFCA 유전자의  $\beta$  형태의 cDNA(accession # BI813314)를 확인할 수 있었다. 이 EST clone은 exon2의 일부분, exon3의 전체 부위, 375bp의 intron3와 20bp의 polyA를 가지고 있었다(그림 12).

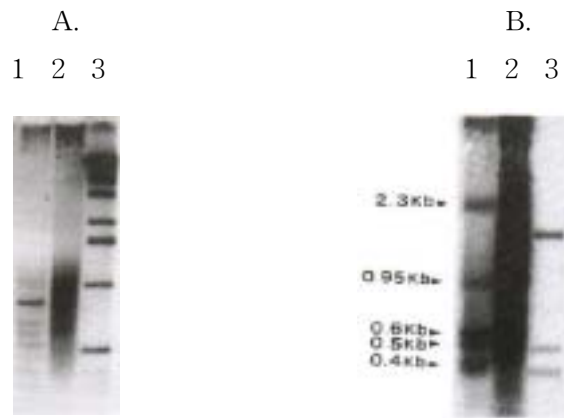


그림 10. 벼 FCA 유전자의 alternatively-splicing form 확인

A. 3'-RACE-PCR 사진. B. Southern hybridization 사진

(lane 1, GSP2와 AP1을 사용한 3'-RACE-PCR 산물; lane 2, GSP1과 AP1을 사용한 3'-RACE-PCR 산물; 1kb DNA ladder)

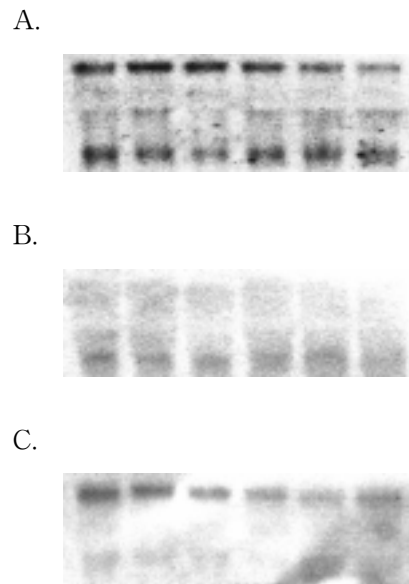


그림 11. OsFCA유전자의 Northern hybridization에 의한  $\beta$ 와  $\nu$  전사체 확인  
 A.  $\beta$ (1kb; 아래 band)와  $\nu$ (3kb; 위 band)에 다 결합할 수 있는 탐침을 사용한 Northern blot; B.  $\beta$ (1kb; 아래 band)에만 결합할 수 있는 탐침을 사용한 Northern blot; C.  $\nu$ (3kb; 위 band)에만 결합할 수 있는 탐침을 사용한 Northern blot



```

      10      20      30      40      50      60
5' ACTATGTCAAACTTTTTGTCGGATCTGTTCCGAGGACAGCGACTGAAGAAGACGTTTCGTC
  Y V K L F V G S V P R T A T E E D V R P

      70      80      90      100     110     120
CTTTATTTGAGGAACATGGAGATGTTCTTGAAGTTGCTCTAATTAAGGATAGGAAGACCG
  L F E E H G D V L E V A L I K D R K T G

      130     140     150     160     170     180
GTGAACAACAAGGZATGCTATGTCTTTGTTTTCTGTATTATCACAATGAGTATCTCTT
  E Q Q G M L C L C F S C I I T M S I S F

      190     200     210     220     230     240
TTGTTTTTCAGGTTTCTGAGAGGTTATAGGAGCAACAAGGTTGCATCTTCTCTCAGTTAGA
  V F R F L R G Y R S N K V A S S L S *

      250     260     270     280     290     300
TTGGCGGTTGTTGATTTTCATTTCTGCGCTCCATTCTGTCGGTCTCCTGTGGATTGAG

      310     320     330     340     350     360
TAGAAGACTAGAATGGACGCGACTAACTGCCCGCTGATTACTGGAACCTAACTAGCCACA

      370     380     390     400     410     420
ACTTCACTGCTACACAAGGAGCAAAATTTGGTACCAACAGCTGTGTTTAGATGATATTGA

      430     440     450     460     470     480
CCTTCTGGATGTCCTGTAGTTCTAGAGCAATGAGCTGTAGTTTCACCTTTGCATCTGTG

      490     500     510     520     530     540
TGCCTTGATTTTGTGCAAGAACTTATATAATCTTATAATGAATTAATACAAAATTCTCA

      550     560
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'

```

그림 12. 벼 EST database에 찾은 OsFCA beta cDNA.  
stop codon은 \*로 표시하였다.

애기장대 FCA의  $\alpha$  전사체는 전체 FCA의 alternative spliced form에서 차지하는 비율이 1%이하로 존재한다고 알려져 있으며, OsFCA 유전자의 경우도 그런 것으로 사료된다. 벼에서 OsFCA의  $\alpha$  전사체를 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR 수행에 필요한 primer는 그림 13a에 표시되어 있다. 이들 primer를 사용하여 벼에서 OsFCA의  $\alpha$  전사체를 확인할 수 있었다 (그림 13b). 이 PCR 산물의 염기서열을 분석한 결과 intron3를 포함한 OsFCA의  $\alpha$  전사체가 맞음을 확인할 수 있었다. 그러나, 벼에서 OsFCA의  $\delta$  전사체를 찾기위해 RT-PCR과 database 검색을 수행하였지만 확인할 수 없었다. 전체적인 OsFCA유전자의 alternative splicing pattern은 그림 14에 표시되어 있다. 이 실험들을 통해서 벼에서 intron3의 alternative processing이 다른 쌍자엽 식물에서처럼 진화적으로 보존되어 있음을 알 수 있었다. 또한, 이러한 사실들은 FCA 유전자에서 intron3가 갖는 기능적인 중요성이 있음을 알 수 있다.

#### 다. 벼 FCA 유전자의 조직 특이적 및 발생시기별 발현 양상 분석

애기장대의 경우 FCA유전자의 발현은 발달단계나 조직간에 별 차이가 없다. 벼에서도 이러한 지를 확인하기 위하여 Northern blot을 통해 확인해 보았다. OsFCA 유전자의 발현은 panicle 발달단계동안 조사한 결과 초기 panicle 조직에서 많이 발현되었으며, panicle 발달단계동안 점차적으로 감소됨을 알 수 있었다 (그림 8a). 그 외에 다른 영양생장 조직에서 OsFCA 유전자의 발현양상을 조사해본 결과 성숙된 조직보다는 어린 조직에서 많이 발현됨을 알 수 있었다(그림8b). 이러한 발현양상은 OsFCA 이외에 자발적인 경로에서 개화시기를 조절하는 다른 유전자인 OsLD와 비교시에도 발현양상인 두 유전자간에 유사함을 알 수 있었다.





그림 14. OsFCA 유전자의 alternative splicing pattern에 의해 만들어진 cDNA들

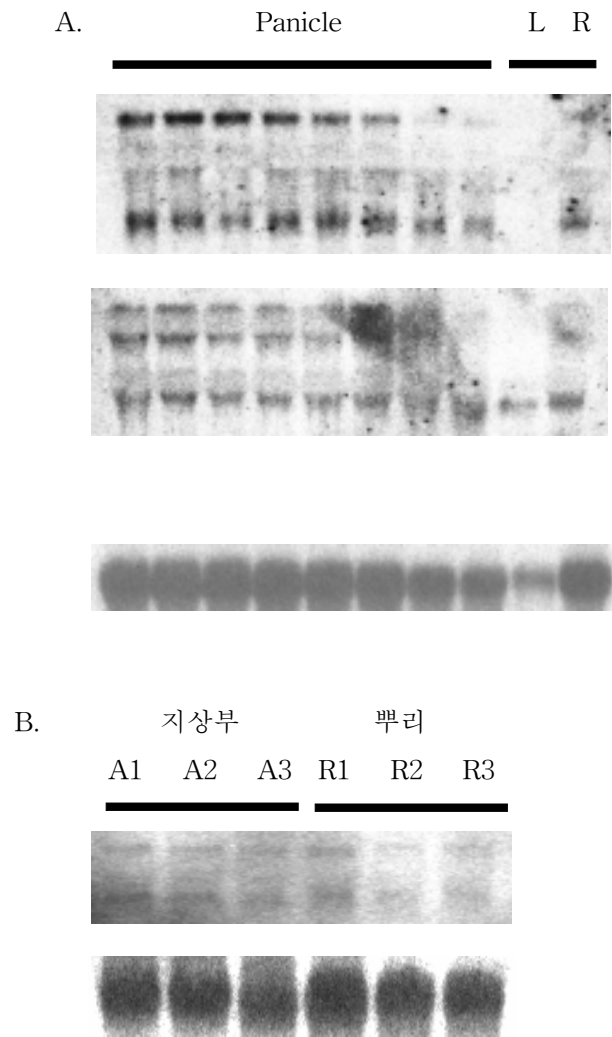


그림 8. OsFCA 유전자의 조직별, 시기별 발현양상

A. OsFCA와 OsLD의 panicle 발달시기(P1-P8)와 성숙한 조직(L, R; 뿌리)에서의 발현양상. 25S rDNA가 동량에 대한 control로 사용되었다; B. seedling 발달동안 지상부(A1-3)와 뿌리(R1-3)에서의 OsFCA 발현양상. 25S rDNA가 동량에 대한 control로 사용되었다

#### 라. 애기장대 FCA와 벼 FCA의 기능 비교분석

애기장대 FCA의 경우  $\nu$  전사체를 암호화하는 cDNA를 35S promoter나 FCA promoter를 연결시켜 *fca-1* mutant에 형질전환시켜 mutant의 형질이 wild type으로 전환됨을 확인한 보고가 있다. 이에 벼에서 분리된 OsFCA 유전자가 애기장대의 기능적 homolog인지를 알아보기 위해 35S promoter를 연결시켜 애기장대 *fca-1* mutant에 형질전환시켜 그 형질을 조사해 보았다. T1 개체의 경우 일부는 심각한 잎의 접힘이 관찰되고 그런 개체는 꽃을 생성하지 못하고 죽어버렸다. 살아남은 개체의 경우는 T2를 얻어 kanamycin 배지에서 3:1의 분리비를 보이는 개체(형질전환된 유전자가 애기장대 유전체에 한 copy가 들어간 것임)에서만 개화시기를 측정하였다. 그 결과 애기장대 *fca-1* mutant의 개화시기가 정상으로 돌아감을 확인할 수 있었다(그림 9). 또한, 개화시기를 측정해 본 결과 *fca-1* mutant는 약 30장 정도에서 개화가 되었으며, 형질전환체의 경우는 16-21장 정도에서 개화가 되는 것으로 보아 벼에서 분리된 OsFCA 유전자가 애기장대 FCA에 대한 기능적 homolog임을 알 수 있다(표 1)

Macknight의 논문(2002)에 따르면 애기장대 FCA 유전자의 발현은 FLC의 감소와 관계가 있다. 이에 OsFCA 유전자로 형질전환된 애기장대 개체에서 여러 유전자들의 발현양상을 Semi-quantitative RT-PCR로 확인을 하였다. 우선적으로 형질전환개체에서 FLC와 AGL20의 발현양상을 조사하였다. 그 결과 #28과 36에서는 FLC의 발현이 여전히 보였지만 #2에서는 거의 발현이 보이지 않았다(그림 10a). 하지만, 여전히 AGL20의 발현은 모든 형질전환체에서 *fca-1* mutant보다 상당히 높았다. 그리고, #2의 경우는 28과 36에 비해 inflorescence로 전환되어있음을 AP1의 발현양상으로 확인할 수 있었다(그림 10c).

그림 10b에서 보다 더 늦은 시기의 형질전환체와 *fca-1* mutant에서 FLC와 AGL20의 발현양상을 측정해 본 결과 어린 시기에서 보다 FLC 발현양상은 떨어지고 AGL20 발현양상이 더 올라가 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 모든 형질전환체에서 벼 OsFCA 유전자가 과다발현되고 있음을 확인할 수 있었다. 이 결과로서 형질전환체의 개화시기 회복은 벼 OsFCA 유전자의 과다발현에 따른 개화시기조절유전자의 발현양상의 변화로 기인했음을 알 수 있다.

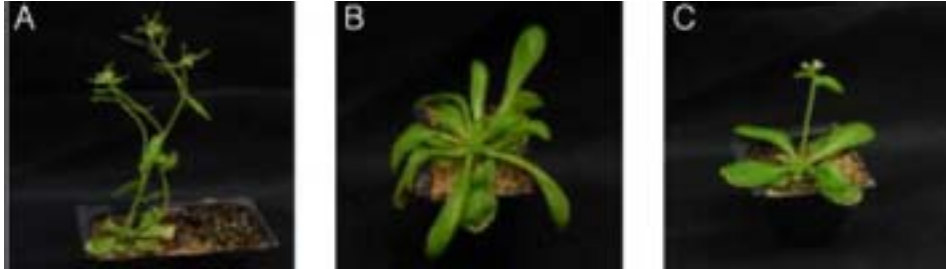


그림 9. 애기장대 *fca-1* mutant의 phenotype rescue

장일조건에서 키웠으며, 왼쪽이 wild type(Ler), 가운데가 *fca-1* 돌연변이체, 오른쪽이 35S::OsFCA를 과다 발현시킨 *fca-1* transgenic line

표1. 35S promoter로 과다발현시킨 *fca-1* 형질전환체에서의 개화시기 측정

| Genetic Background                  | Leaf No. at flowering time in LD <sup>a</sup> | No. of plants |
|-------------------------------------|---|---------------|
| <i>Ler</i>                          | 9.6±1/1 <sup>b</sup>                          | 12            |
| <i>Ler fca-1</i>                    | 26.5±4.0                                      | 12            |
| <i>Ler fca-1</i> + 35S::OsFCA line1 | 16.9±4.4                                      | 42            |
| <i>Ler fca-1</i> + 35S::OsFCA line2 | 17.4±3.5                                      | 22            |
| <i>Ler fca-1</i> + 35S::OsFCA line3 | 19.2±5.2                                      | 18            |
| <i>Ler fca-1</i> + 35S::OsFCA line4 | 20.9±2.6                                      | 26            |

a 잎 수는 rosette과 cauline 잎을 다 포함하여 측정하였으며, 장일조건(16시간 명, 8시간 암)에서 키웠다.

b Error는 1SD로 표시되었다.



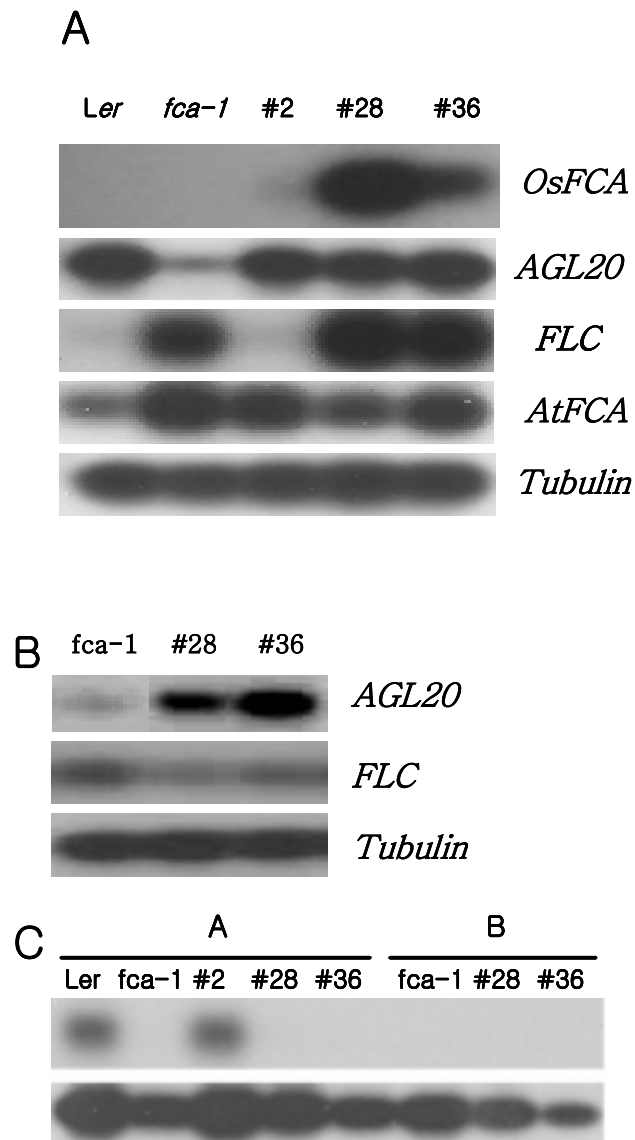


그림 10. 35S::sense *OsFCA* 유전자로 형질전환된 애기장대 *fca-1* mutant에서의 여러유전자들의 발현양상. A, 27일정도 키운 개체에서의 *OsFCA*, *AGL20*, *FLC*, *AtFCA* semiquantitative RT-PCR; B, 34일정도 키운 개체에서의 *OsFCA*, *AGL20*, *FLC*, *AtFCA* semiquantitative RT-PCR; C. A와 B sample들에 대한 AP1 발현양상

마. 벼에서 애기장대의 다른 개화시기 조절 유전자 확보 및 형질전환체 생산

1) 벼에서 COL(CO-like) 유전자의 연구

가) COL 유전자의 특징 분석

애기장대의 경우 16개의 COL 유전자가 보고가 되어있으며, 그중 COL1과 COL2만이 기능이 연구되어 있다. 하지만, 벼의 경우에는 Hd1 유전자가 애기장대 CO homolog로 보고가 되었으며 (Yano et al., 2000), 아직 그 이외의 CO-like 유전자에 대해서는 밝혀진 바가 없다. 하지만 Sasaki group에 의해 과거에 CO와 유사한 zinc finger protein이 보고 (Song et al., 1998)가 된 적이 있는데 이 유전자에 대해서는 기능분석이 되어 있지 않은 상태였다. 본 연구팀은 이 유전자를 OsCOL이라 명명하고 일품벼에서 RT-PCR을 통해 cDNA clone을 얻었다. 이 유전자의 아미노산 서열을 애기장대와 비교해본 결과 COL2와 전체적으로 53%의 유사성을 보였으며, CO유전자의 두개의 domain과 비교시에는 67% 동일성(하나의 B-box)과 90% 동일성(CCT domain)을 보였다. OsCOL유전자는 애기장대 COL2이외에 다른 COL(6,7,8)유전자들과 구조가 유사하였다. 이 유전자들은 애기장대 CO나 벼 *Hdl* (이들은 두개의 B-box와 한개의 CCT region을 가진다)과 달리 B-box가 하나이며 CCT region은 가지고 있었다 (그림 11)

나) 벼에서 COL(CO-like) 유전자의 circadian rhythm 양상 조사

애기장대의 광주기경로에 작용하는 GI나 CO의 경우는 circadian rhythm을 따른다는 보고 (Park et al., 1999; Suarez-Lopez et al., 2001)가 있으며, 또한, 벼의 OsGI나 Hd1의 경우도 circadian rhythm을 따른다는 보고 (Kojima et al., 2002; Izawa et al., 2002; Hayama et al., 2003)가 있었다. 이러한 사실에 비추어 OsCOL의 경우도 circadian rhythm을 따르는지 여러 광주기 조건에서 시간별로 sample을 채취하여 semiquantitative RT-PCR로 확인해보았다. 이때, circadian rhythm 비교를 위해 OsGI와 Hd1 유전자에 대해서도 조

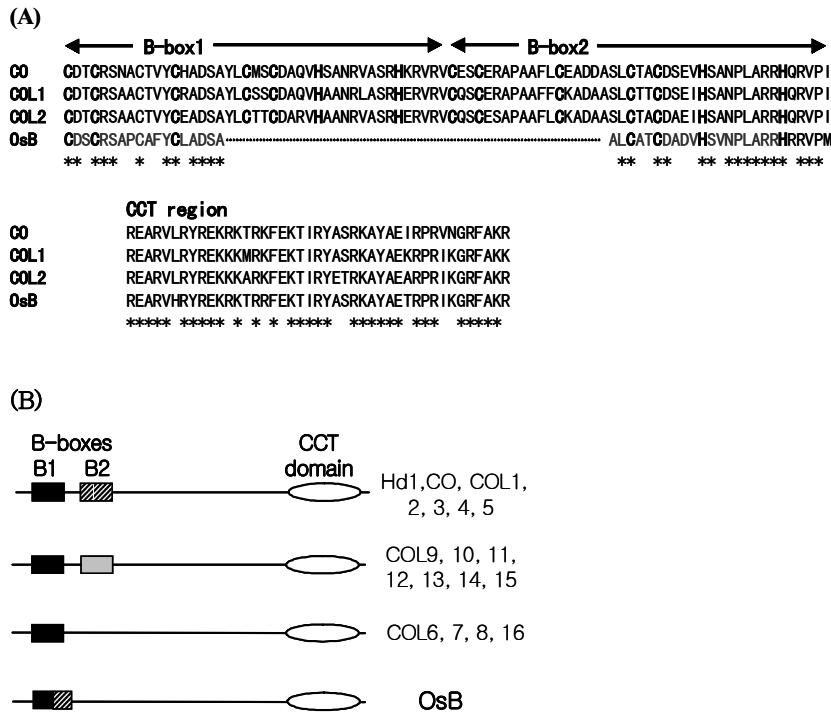


그림 11. OsCOL과 다른 애기장대 Co family간의 아미노산 및 domain 구조 비교

A, OsCOL(OsB)과 애기장대 CO family(CO, COL1, 2)와의 아미노산 서열 비교; B, OsCOL(OsB)과 애기장대 여러 CO family에서 domain 구조 비교

사하였으며, 또한, 동량에 대한 대조구로 OsACTIN을 사용하였다. 장일조건(14시간 명조건/ 10시간 암조건)에서는 OsGI가 암조건으로 전환시 높은 발현양상을 보였고, Hd1은 반대로 명조건으로 전환시 높은 발현양상을 보였다. 그러나, Hd1과 유사한 OsCOL의 경우는 암조건으로 전환된지 3시간 쯤나 명조건으로 전환된지 3시간째에 높은 발현양상을 보였다(그림 12).

벼는 장일식물인 애기장대와 달리 단일식물로 알려져 있다. 이러한 사실에 근거를 두고 하루정도 단일 조건(10시간 명조건/14시간 암조건)에서 키운후 지속적인 명상태를 유지하여 OsGI, Hd1, OsCOL의 발현양상을 조사해보았다. OsGI의 경우는 명조건에서 높은 발현양상을 보였고, 지속적인 명조건에서도 높은 발현양상을 유지하였다. Hd1의 경우는 장일조건과 달리 명조건으로 바뀐지 15시간째에 높은 발현을 보였고, 명조건에서도 어느 정도 높은 발현양상을 보였다. OsGI와 비교시에는 명조건이 지날수록 둘 간의 발현양상의 차이가 감소되는 경향을 확인할 수 있었다. OsCOL의 경우는 명조건으로 전환될시 높은 발현양상을 보였고, 시간이 갈수록 감소되는 양상을 보였다. 지속적인 명조건에서는 어느 정도 발현양상이 rhythmicity를 보였지만 전체적인 발현양상의 폭이 넓어진 것을 확인할 수 있었다. 전체적으로 OsGI, Hd1, OsCOL 모두 단일조건 후에 지속적인 명조건으로 바뀔 시 시간이 갈수록 circadian control이 감소되었지만 어느 정도 유지되는 것을 확인할 수 있었다(그림 13). 또한, OsCOL 유전자의 장일조건과 단일 조건에서의 circadian expression 양상을 비교해보았다 (그림 14).

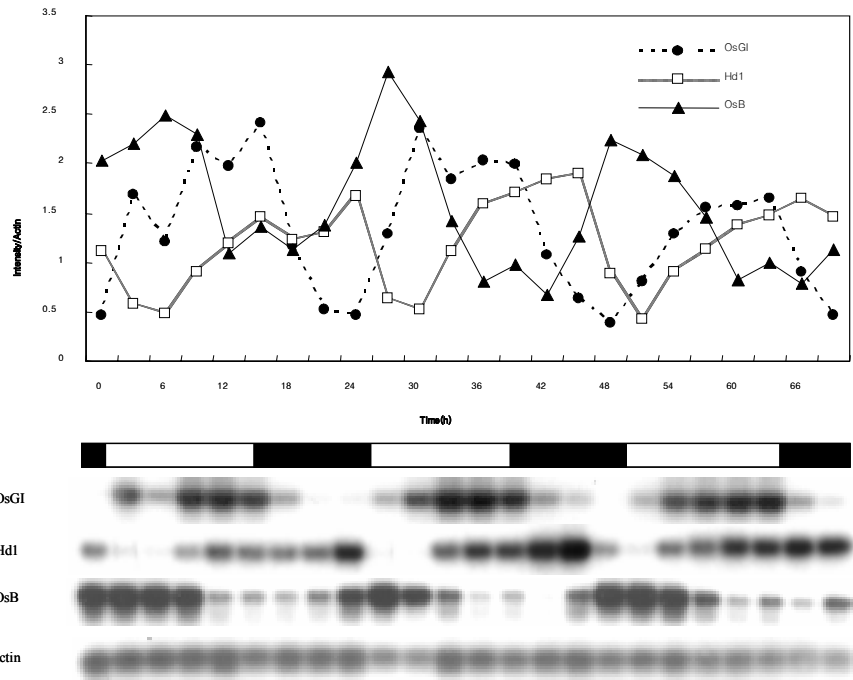


그림 12. 장일조건에서의 벼의 여러 개화시기 조절 유전자에 대한 circadian 발현양상 비교

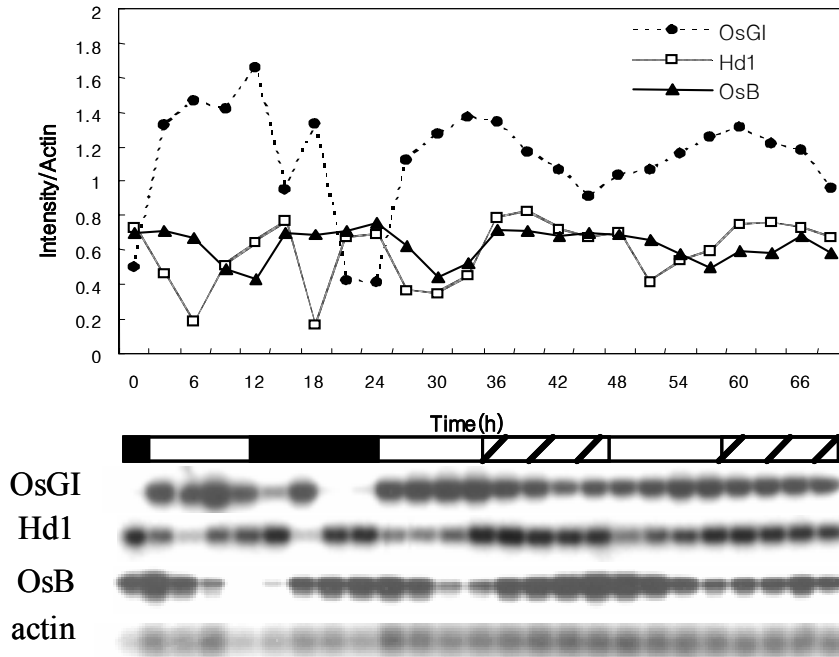


그림 13. 단일조건에서 계속적인 빛 조건으로 전환 시 벼의 여러 개화시기 조절 유전자에 대한 circadian 발현양상 비교

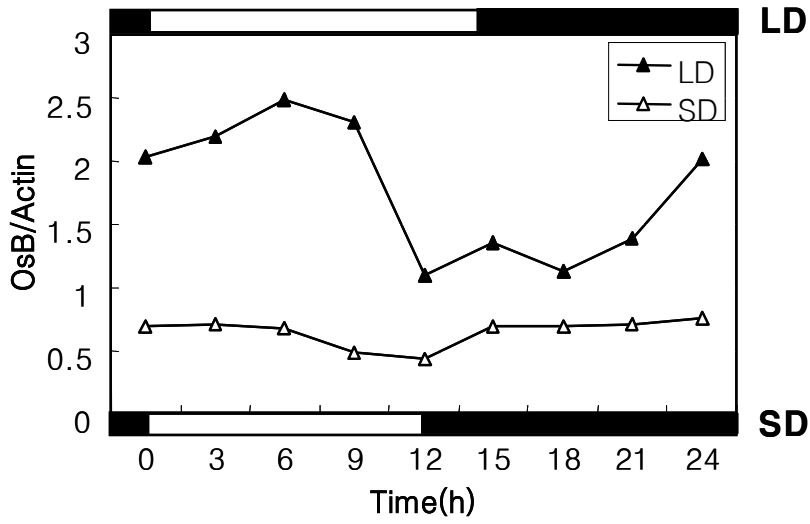


그림 14. 장일과 단일 조건에서 *OsCOL* 유전자의 circadian 발현양상 비교

## 2) 벼에서 FDRMADS8 유전자의 연구

### 가) FDRMADS8 유전자의 특징 분석

벼에서 애기장대의 개화시기조절 유전자에 대한 homolog를 확보하기 위하여 애기장대 개화시기 조절 유전자의 아미노산 서열을 이용하여 벼의 database를 검색하였다. NCBI *Oryza sativa* L. DB(Indica)와 Syngenta사의 Torry mesa DB(japonica)에 각각 애기장대 AGL20의 아미노산 서열을 이용하여 탐색하여 E-value가 90이상으로 homology가 높은 단백질을 다음과 같이 표로 정리하였다 (표 2와 3). 가장 상동성을 갖는 단백질은 FDRMADS8과 rice MADS like gene으로 scaffold 005709는 rice MADS like gene(AB003328)의 K domain부위이다. 그 이외에 다른 MADS 유전자들이 서로 비슷한 경향으로 뒤를 이어 나타나는 것을 관찰할 수 있다. 결론적으로 벼의 전체 유전정보에서 애기장대 AGL20의 단백질 서열과 가장 유사성을 보이는 단백질은 FDRMADS8과 rice MADS like gene이라고 할 수 있다. 애기장대 AGL20 유전자의 아미노산과 상동성을 비교해 본 결과 이 두 유전자는 전체적인 동일성은 51-54%였지만 MADS box domain 부분에서는 60-63%의 동일성을 보였으며 기존에 알려진 꽃기관 결정에 관여하는 벼의 다른 MADS box 유전자 (AP1, AP3, AG, PI-like gene)의 경우(전체적인 동일성 29-39%)보다 아주 높은 유사성을 보였다 (표 4와 그림 15). 또한, 애기장대 AGL20은 phylogenetic analysis시 애기장대의 다른 MADS box 유전자인 AGL14, AGL19와 같은 group에 속한다는 보고가 있었다(Alvarez-Buylla, et al., 2000a; Alvarez-Buylla, et al., 2000b). 애기장대 AGL20에서 비교한 것과 마찬가지로 벼의 여러 MADS box 유전자와 애기장대 AGL14, AGL19와 아미노산 상동성을 비교해 본 결과 이 두 유전자도 벼의 floral organ identity를 결정하는 MADS box 유전자보다 putative AGL20 homologue라 여겨지는 clone과 더 유사함을 알 수 있었다. 또한, 우리가 찾은 벼의 putative AGL20 homologue가 애기장대의 AGL14나 AGL19보다 AGL20과 더 유사한지를 알아보기 위하여 아미노산 서열을 이용한 phylogenetic analysis를 수행해보았다. 그 결과 벼의 AGL20 homologue라 여겨지는 clone이 AGL14나 AGL19보다



표 2. AGL20 homolog in the *Oryza sativa* L. genome (Indica)

| Best score in rice<br>(90~100) | Known rice homologs               |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| Scaffold002055                 | FDRMADS8 (AF141965, 1e-24)        |
| Scaffold000233                 | FDRMADS8 (AF141965, 9e-38)        |
| Scaffold000698                 | OsMADS15 (AF058698, 4e-26)        |
| Scaffold005138                 | OsMADS17 (AF109153, e-104)        |
| Scaffold000742                 | OsMADS13 (AF191693, e-100)        |
| Scaffold023457                 | OsMADS5 (U78890, e-104)           |
| Scaffold001066                 | OsMADS3 (L37528, e-112)           |
| Scaffold002688                 | OsMADS1 (L34271, e-121)           |
| Scaffold000718                 | AGMOUS (AP003379, 0)              |
| Scaffold001754                 | OsMADS45 (U31994, e-124)          |
| Scaffold003905                 | OsMADS8 (U78892, e-109)           |
| Scaffold000141                 | RAP1B (AB041020, 9e-84)           |
| Scaffold006256                 | OsMADS2 (L37526, 1e-20)           |
| Scaffold008729                 | OsMADS1 (AF204063, 2e-17)         |
| Scaffold007572                 | OsMADS18 (AF091458, e-102)        |
| Scaffold003999                 | OsMADS3 (L37528, 7e-16)           |
| Scaffold017761                 | OsMADS13 (AF151693, 6e-59)        |
| Scaffold005709                 | Rice MADS like gene (AB003328, 0) |

㉟ 3. AGL20 homolog in the *Oryza sativa* L. genome (Japonica)

| Best score in rice (90~100) | Known rice homologs  |
|-----------------------------|--|
| CL046238.79.18              | Rice MADS like (AB003328, 3e-24)                           |
| HTC141497-B01.1.1           | FDRMADS8 (AF141965, 1e-24)                                 |
| CL030994.55                 | FDRMADS8 (AF141965,<br>1e-19,86%)                          |
| CL055095.68.70              | OsMADS15 (AF058698, 4e-26)                                 |
| CL035953.80                 | OsMADS6 (U78782, 2e-25)                                    |
| CL004886.208                | OsMADS13 (AF151693, 4e-27)                                 |
| CLB6133.4                   | OsMADS6 (U78782, 2e-25)                                    |
| CL019873.131                | OsMADS5 (U78890, 4e-25)                                    |
| CL015494.3                  | OsMADS1 (AF204063, 7e-27)                                  |
| CL011309.338                | putative transcription factor<br>AGAMOUS (AP003379, 7e-27) |
| CLC9677                     | OsMADS13 (AF151693, 3e-25,<br>95%)                         |
| CLB2370.1                   | OsMADS45 (U31994, 8e-26)                                   |
| CL002227.118                | OsMADS8 (U78892, 2e-25)                                    |
| CL005383.94                 | RAP1B (AB041020, 7e-25)                                    |
| CL016620.132                | Rice MADS like (AB003324, 5e-26)                           |

표 4. 벼의 여러 MADS box 유전자들과 애기장대 AGL20 유전자간의 아미노산 identity와 similarity 비교

괄호밖과 안의 수치는 각각 아미노산 identity와similarity percentage를 표시한다. accession number(1;AB041020, 2:AF077760, 3:L37528, 4:L37526, 5:AB003328, 6:AF141965)

| rice Arabidopsis | AP1-like <sup>1</sup><br>(RAP1B) | AP3-like <sup>2</sup><br>(OsMADS16) | AG-like <sup>3</sup><br>(OsMADS3) | PI-like <sup>4</sup><br>(OsMADS2) | rice MADS-like gene <sup>5</sup> | rice fdMADS <sup>6</sup> |
|------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| AGL20            | 38(65)                           | 30(55)                              | 37(64)                            | 29(51)                            | 54(74)                           | 51(76)                   |
| AGL14            | 35(64)                           | 28(53)                              | 34(66)                            | 30(55)                            | 50(70)                           | 51(70)                   |
| AGL19            | 37(62)                           | 27(52)                              | 36(67)                            | 27(53)                            | 53(72)                           | 53(75)                   |

```

AGL201          MVRGKTQMKRIENATSRQVTFSKRRNGLLKKAFELSVLCDAEVSLIFSPKGKLYEFASS
MADS-like gene2 MVRGKTQMKRIENPTSRQVTFSKRRNGLLKKAFELSVLCDAEVALIVFSPRGKLYEFASA
FDRMADS82      MVRGRTELKRIENPTSRQVTFSKRRNGLLKKAFELSVLCDAEVALIVFSPRGRLYEFASA
                **** *  ***** ***** ***** ***** ***** ** ** *  *****

AGL201          N-MQDTIDRYLRHTKDRVSTKPVSEENMQHLKYEAANMMKIEQLEASKRKLLEGEGIGTC
MADS-like gene2 S-TQKTIERVRTYTKENIGNKTVQQD-IEQVKADADGLAKKLEALETYKRKLLGEKLEDC
FDRMADS82      PSLQKTI DRYKAYTKDHSVNNKTIQQD-IQQVKDDTLGLAKKLEALDESRRKILGENLEG
                * * * * *  *          *          * * * *  * * * * *  *

AGL201          STEELQIEQLEKSVKCI RARKTQVFKEQIEQLKQKEKALAAENEKLSKSWG-----SH
MADS-like gene2 STEELHSLEVKLESLISIRGRKTKLLEEQVAKLREKEMKLRKDNEELREKCK---NQPP
FDRMADS82      SIEELRGLMKLEKSLHNI RLLKKTellerQIAKLKEKERTLLKDNEENLRGKHRNLEAAL
                ***** * * * *  * * * *  * * * *  * * * *  *

AGL201          ESEVWSNKNQ-----ESTGRGDEESSPSSEVETQLFIGLPCSSRK-----
MADS-like gene2 LSAPLTVRAE-----DENPDRNINTTNDNMDVETELFIGLPGRSRSSGGAEDSQAMPHS
FDRMADS82      VANHMTTTPAAPWPRDVPMTSSTAGAADAMDVETDLYIGLPGTERSSNRSETG-----
                * * * *  * * * *  *

```

그림 15. 벼의 putative AGL20 homologue와 애기장대 AGL20 유전자간의 아미노산 alignment 결과

1; 애기장대, 2; 벼의 putative AGL20 homologues

AGL20에 더 가까운 유연성을 보이며, 다른 벼의 floral organ identity 결정에 작용하는 MADS box 유전자는 다른 group에 속함을 알 수 있었다 (그림 16).

#### 나) FDRMADS8의 발현양상분석

지금까지 연구된 바에 의하면 애기장대 AGL20 유전자의 경우를 살펴볼 때 애기장대의 조직별 RNA를 이용한 RT-PCR를 통해 flowering stage와 vegetative stage에서 조직별로 모두 발현된다고 보고되었다(Lee et al., 2000). 이 연구에서 탐색된 벼의 putative AGL20 homologue들도 이러한 발현양상을 보이는지 알아보기 위해 northern blot 분석을 수행하였다. FDRMADS8 cDNA의 특징적인 발현을 관찰하기 위해서 두 유전자가 상당한 유사성이 있는 MADS box, I, K domain을 제외한 C-terminal domain부위를 5', 3' primer를 디자인하여 PCR 증폭한 뒤 probe로 사용하였다. 또한, 조직별 발현양상을 보기 위하여 flowering stage (panicle 1-9 stages1)와 vegetative stage (Seedling and leaf, root 1-6 stages, Hoshikawa et al. 1989)로 나누어 RNA membrane을 준비하였고, 각각의 발현양상을 관찰하였다 (그림 17). 그 결과 FDRMADS8 유전자가 영양 생장기와 생식 생장기에서 모두 발현되며 flowering stage에서 일관되게 발현되는데 비해서, vegetative stage에서는 아주 약하게 발현되었다. 다시 후기 단계의 잎과 뿌리의 RNA를 loading하여 membrane을 만든 뒤 northern blot분석을 수행한 결과 일정하게 발현되는 것을 비교해 볼 수 있었다. OsMADS1은 flowering stage에서 강하게 발현하므로 control로 사용하였다. 이 실험에서 벼에서 찾아낸 putative AGL20 homologue가 애기장대 AGL20의 발현양상과 유사한 양상을 보인다는 결론을 내릴 수 있다.

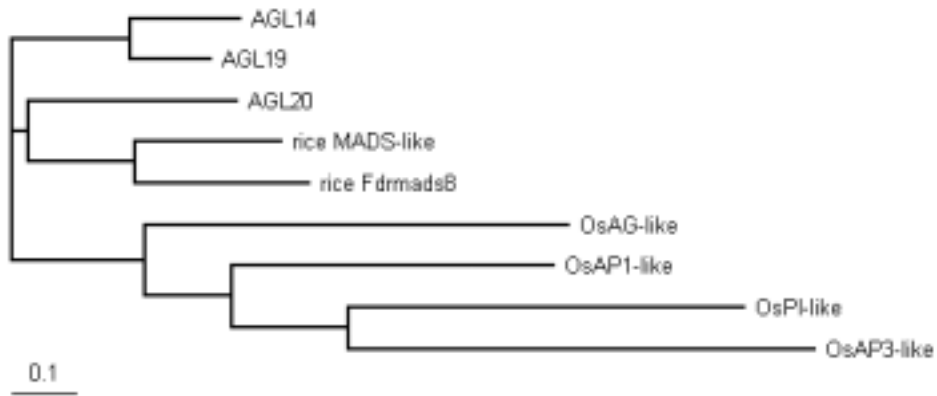


그림 16. 애기장대 AGL20과 벼의 여러 MADS box 단백질들간의 phylogenetic tree.

OsAP1, AP3, AG, PI는 벼의 floral organ identity 단백질; AGL14, 19는 애기장대 AGL20과 phylogeny상 유사한 애기장대의 MADS box 단백질; rice MADS-like와 fdmads8은 애기장대 AGL20의 putative homologue.

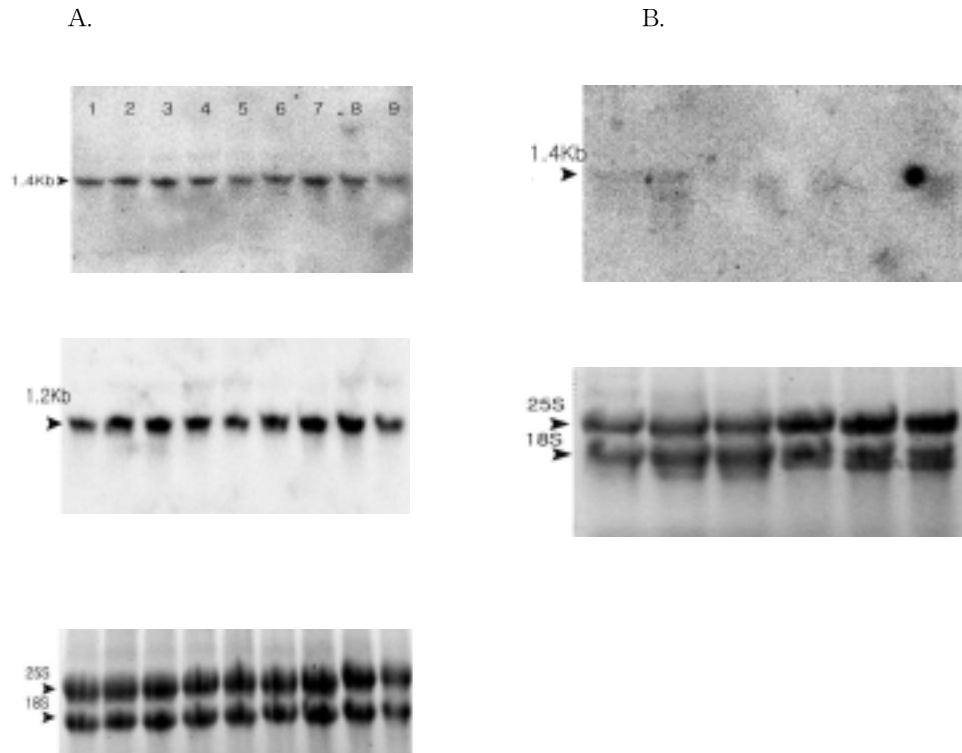


그림 17. 벼의 putative AGL20 homologue transcript의 northern blot analysis  
 (A) Flowering stage에서의 panicle 단계별 FDRMADS8, OsMADS1의 발현양상. Panicles(1-9 stage)에서 분리한 total RNA 40ug의 RNAs. 괄호 안의 수치는 상대적인 (B) Seedling stage에서의 잎과 뿌리에서의 FDRMADS8의 발현양상. (1: 1.2-2.0 leaf, 2: 2.5 leaf, 3: 3.2 leaf, 4: 1.2-2.0 root, 5: 2.5 root, 6:3.2 root). 각 stage별, 조직 별 total RNA 30ug의 RNAs. 가장 아래 box는 RNA loading시 25S와 18S rRNA의 위치와 양을 나타낸다.

(다) 벼 FDRMADS8의 형질전환체 생산 및 분석

벼의 FDRMADS8의 cDNA는 전체 729bp 구성되어 있으며 233개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하는 유전자이다. 벼의 FDRMADS8의 cDNA를 pBluescript에 cloning 되었던 플라스미드로부터 PCR 하여 30mer attB adapter를 붙여주었으며 invitrogen사의 Gateway<sup>TM</sup> Technology를 이용하여 pDONR 201 vector를 거쳐 pSB11(pMJC-GB) vector에 삽입한 후 Tri parental mating 방법으로 식물형질전환용 vector pSB1에 삽입하여 식물발현 vector pSB111를 만들었다(그림 18). 이것을 Agrobacterium에 형질전환 한 후 rice의 embryo로부터 induction된 callus에 infection하여 형질전환 하였다. FDRMADS8을 과다 발현시키기 위해 Cytochrom C promoter를 사용하였으며 selection marker로는 phosphonothricin acetyl transferase gene(bar)를 사용하였다.

벼의 형질전환체 생산에 대한 자세한 체계는 그림 19에서 도식화하였다. 우선 낙동벼의 종자를 70% ethanol, 50% ROX (유한락스원액 : 3차 살균증류수 = 1:1), 그리고 3차 살균증류수로 깨끗이 소독한 후, callus 유기배지인 2N6 배지에 암 상태에서 약 1달간 28℃에서 향온 배양하여 callus를 유기 시켰다. 이때 유기된 callus를 Agrobacterium과 co-cultivation을 하였다. Cocultivation 과정은 callus 유기배지에서 5일정도 자란 embryogenic callus에 OD600 값이 1.5-2.0가 되는 Agrobacterium에 acetosyringone(AS)을 20ppm 되게 넣고 15분간 감염시켰다. 그 후 acetosyringone이 들어있는 2N6-AS 배지에 옮기고 암상태에서 3일간 25℃에서 향온배양하였다. 3일 후 이를 cefotaxime(250ppm)이 들어있는 살균증류수로 씻어주고 phosphinothricin (selection marker)이 포함된 2N6-CP(cefotaxime 250ppm, phosphinothricin 6ppm) 배지로 옮긴 후 한 달간 28℃에서 향온배양하고, 형질전환된 callus를 재분화배지에 넣어 재분화를 유도하였다. 형질전환체중 basta로 처리하여 저항성이 있는 것을 선택하여 genomic barsta gene의 PCR을 수행하였다. FDRMADS8은 벼의 내부에 가지고 있는 유전자이므로 외부로부터 들어온 basta 유전자로 PCR을 수행하여 외부유전자 도입여부를 확인하였다 이 PCR 결과로 batsta 유전자를 probe로 이용하여 southern blotting 을 실행하였다. 이것을 통하여 genomic DNA의 삽입



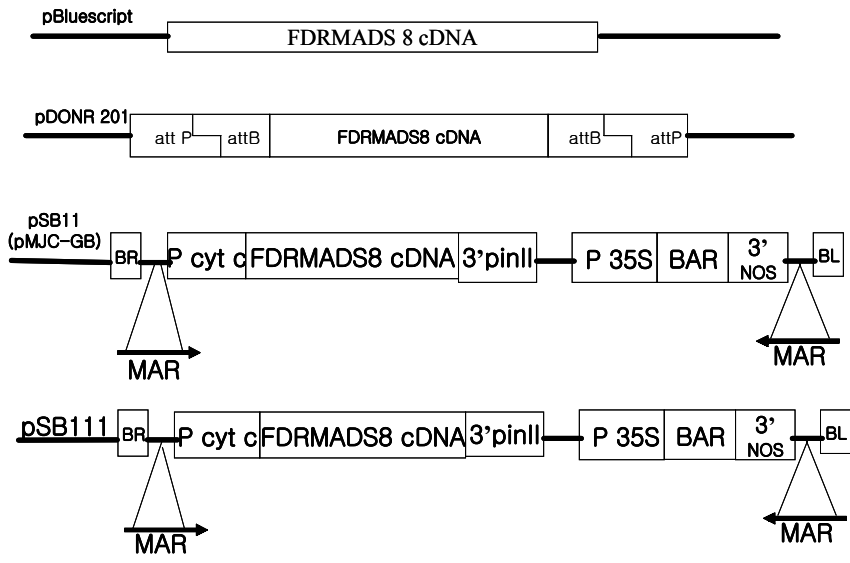


그림18 FDRMADS8 cDNA의 형질전환 벡터로의 삽입과정

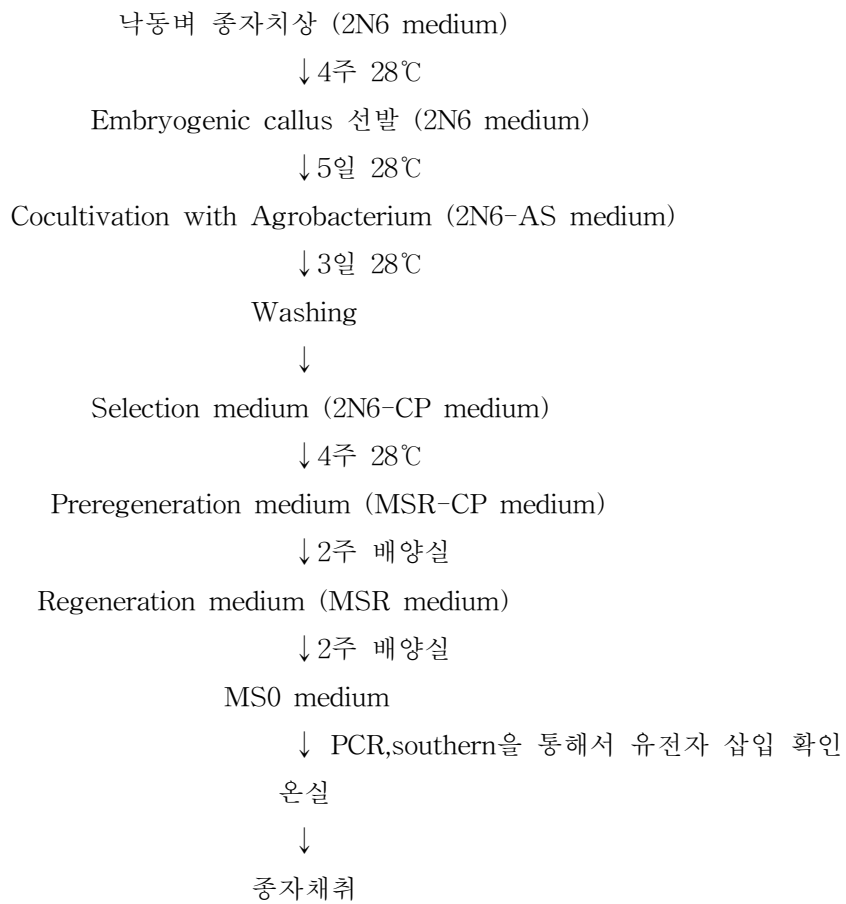


그림 19. 벼 형질전환 추진체계 모식도

FDRMADS8 형여부를 확인하였다.(그림 20) 확인된 개체중에서 유전자의 과다발현이 이루어지는지 알아보기 위해 RNA의 level을 알아보는 Northern blotting 을 수행하였다. (그림 21) T0세대에서 외부로부터 도입된 FDRMADS8 유전자가 과다발현 된다는 것을 확인하고 T0세대의 특성과 출수기를 조사하고 있다. (표 5)

### 3) 애기장대 FT 유전자에 대한 벼 형질전환체 생산

유전학적으로 애기장대 FT는 전사조절 인자인 CO의 하위에 속하고 개화 신호를 API으로 전달하며, 정단분열조직 정체성 결정 유전자 (flower meristem identity gene)인 LFY와 평행하게 작용하여 개화시기를 조절하는 것으로 알려져 있다 (Ruiz-Garcia et al., 1997; Kardailsky et al., 1999). FT를 Cauliflower 모자이크 바이러스의 35S 프로모터를 이용하여 과다발현시키면 형질전환체의 개화시기가 매우 빨라지고 FT 기능이 불활성화된 돌연변이체는 개화시기가 현저히 느려진다. 이러한 사실로 보았을때 FT는 애기장대의 개화시기 조절에 매우 결정적인 역할을 하고 있는 것으로 보인다. 이러한 사실에 비추어 애기장대 FT를 다른 단자엽 식물인 벼에 형질전환을 할 시 개화시기에 어떠한 영향을 미치는지 알아보하고자 하였다.

애기장대 FT의 cDNA는 전체 543bp 구성되어 있으며 175개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하는 유전자이다. 애기장대 FT의 cDNA를 pBluescript에 cloning 되었던 플라스미드로부터 PCR 하여 30mer attB adapter를 붙여주었으며 invtrogen사의 Gateway<sup>TM</sup> Technology를 이용하여 pDONR 201 vector를 거쳐 pSB11 (pMJC-GB) vector에 삽입한 후 Tri parental mating 방법으로 식물형질전환용 vector pSB1에 삽입하여 식물발현 vector pSB111를 만들었다(그림 22). 이것을 Agrobacterium에 형질전환 한 후 rice의 embryo로부터 induction된 callus에 infection하여 형질전환 하였다. 애기장대 FT를 과다 발현시키기 위해 Cytochrom C promoter를 사용하였으며 selection marker로는 phosphonothricin acetyl transferase gene(bar)를 사용하였다.

벼의 형질전환체 생산은 FDRMADS8과 동일하다. 형질전환체로부터 애기

WT C 1 2 3 7 14 16 18 20 21 23 27 28 29 30 33 35 36 39 40 41 42 46



그림 20. FDRMADS8 형질전환체의 genomic Bar PCR

FDRMADS8은 벼의 내부에 있는 유전자 이므로 외부로 도입된 basta 유전자를 이용하여 PCR을 수행 또한 basta유전자를 probe로 하여 Southern blotting을 수행하였음 control로는 pCAMBIA3300 plasmid와 야생형 낙동을 사용하였고 #2,3,0,28,33,35,36,39,40,41,46번 개체에서 basta 유전자가 있음을 확인할 수 있음

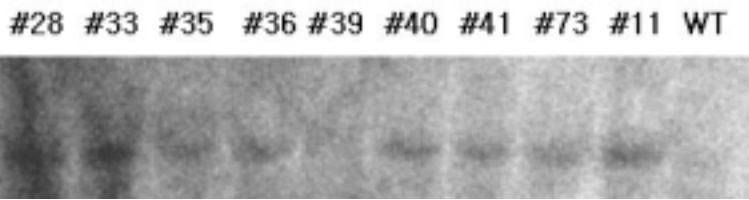


그림 21. FDRMADS8 형질전환체의 RNA 발현양상

외부로부터 도입된 FDRMADS8 유전자가 얼마만큼 과다 발현되는지 알아보기 위해 Northern blotting 수행 #28,33,35,36,40,41,73,11번 개체는 야생형 낙동 보다 많은 양의 FDRMADS8 유전자가 발현되는 것을 알 수 있음

표5 FDRMADS8유전자를 형질 전환한 T0세대의 재분화 및 형질 전환체수

| 치상종자수 | 공동배양한<br>켈러스수 | 제조제 저항성<br>켈러스 수 | 재분화 식물체수  | basta 저항성<br>형질전환개체수 |
|-------|---------------|------------------|-----------|----------------------|
| 2880  | 980           | 350              | 97 (3.6%) | 28 (3.5%)            |

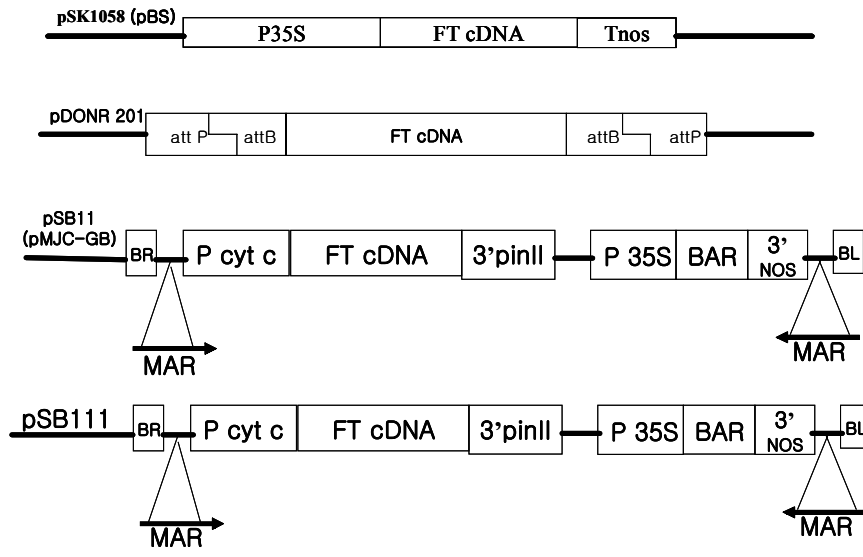


그림 22 애기장대 FT cDNA의 형질전환 벡터로의 삽입과정

장대 FT 유전자 genomic PCR을 수행하여 애기장대 FT를 probe를 이용하여 southern hybridization을 통하여 애기장대 FT cDNA가 삽입된 것을 확인하고 (그림 23), T0 세대의 표현형을 관찰하고 있다.(표 6)

## 2. 벼 FCA의 유전자 분리 및 FCA와 COL의 형질전환체 생산 (협동과제)

### 가. 벼 FCA genomic DNA의 완전염기서열 결정 및 특성 구명

벼 FCA genomic clone은 확보된 FCA cDNA를 탐침으로 하여 미국 Clemson university에서 구축한 벼 품종 Nipponbare의 BAC library를 Southern hybridization을 통하여 FCA의 genomic DNA를 함유하고 있는 것으로 추정되는 16개의 positive clone(01L11, 04H23, 50M01, 64I18, 60D10, 09G08, 04J21, 49O21, 74D20, 88K05, 72L17, 45P10, 16N10, 79A04, 52I16, 60K05)를 선발하였다(그림 24). 선발한 positive clone의 BAC DNA를 분리하여 HindIII로 처리하여 전기영동한 후 탐침에 positive signal을 나타내는 각 BAC clone 유래의 DNA 단편(그림 25)중에서 BAC clone 09G08의 HindIII 단편(약 11Kb)을 gel elution하였다.

선별된 clone(09G08)에서 FCA 유전자의 전 염기서열을 포함하고 있을 것으로 사료되는 DNA 단편(10.7kb)을 pBluescript에 subcloning하였고 sequencing primer를 작성하여 염기서열을 결정하였다(그림 26).

벼의 FCA 유전자는 16개의 인트론을 가지고 있으며 genomic DNA상의 개시 코돈과 종결 코돈을 포함하는 open reading frame은 8030개의 뉴클레오티드로 구성되어 있었다(그림 27). 일반적으로 통용되는 intron의 GT-AG 규칙에 맞게 벼 FCA의 intron은 모두 다 GT로 시작하여 AG로 끝났다.

### 나. FCA 유전자의 분자유전자지도 작성

FCA 유전자의 벼 염색체 위치 정보를 얻기위하여 국내 벼 연구연구에서



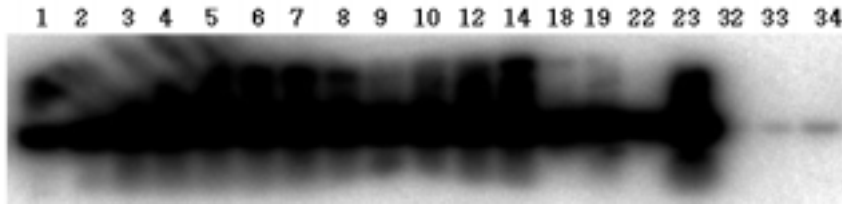


그림 23. 애기장대 FT 형질전환체의 genomic PCR

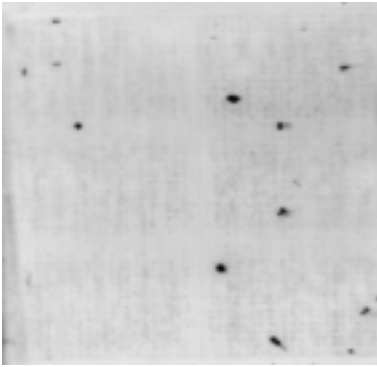
애기장대 FT 유전자를 probe로 하여 PCR Southern blotting을 수행

#1,2,3,4,5,6,8,7,9,10,14,22,23,32,33,34개 체에서 외부로 도입된 애기장대 FT 유전자가 있음을 확인

표6 애기장대 FT 유전자를 형질전환 한 T0세대의 재분화 및 형질전환체수

| 치상종자수 | 공동배양한<br>켈러스수 | 제초제 저항성<br>켈러스 수 | 재분화 식물체수 | basta 저항성<br>형질전환체수 |
|-------|---------------|------------------|----------|---------------------|
| 2880  | 967           | 300              | 52(5.8%) | 14(3.7%)            |

BAC 필터 A



BAC 필터 B

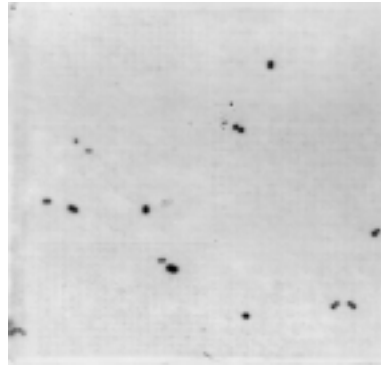


그림 24. 벼의 BAC 은행으로 부터의 FCA 유전자를 함유하고 있는 BAC clone

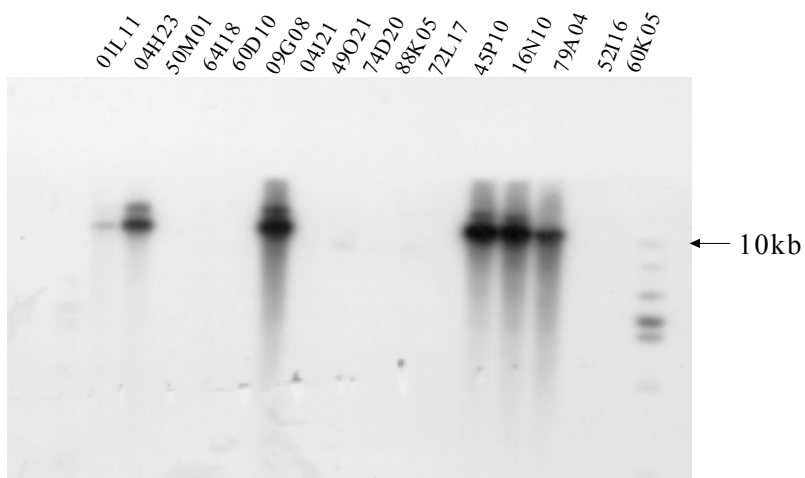


그림 25. FCA의 genomic DNA 함유 BAC clone의 Southern hybridization

aagcttaaacaacaattttgaataactaatataacatatgtgcatatcatcaatttggacttatatagtataactatac 80  
tatatatgttggacttggcaacaagtgagagctaacagtgatataaagaagatttaaatggagattttaa 160  
tatatatgtccaaatggatgtcagctgatacaactcatccaagtataatactctccgtttcaaatataagacgtt 240  
ttgacttcgggtcaaatgcaactgtttcaagtttgactaagatcatagacaaatatagtaatattataactaataat 320  
agtttcatataatcaataatgaataatatttcataataaattatcttgggttgaaaatgtactactttttctaaa 400  
acttggtaaaacttaaaacaatagactttgacaaaaacaaaacgtctataacctgaaacggagagatcaaaatag 480  
ataaaaacatatacaaaaacaccttaagagataataatgaactgttttgaagttagggagttagatatactagttt 560  
aaagtttaagatgccttacaacttctataatgtagttagagggtatttggacttttttaagagaataataatatttt 640  
taatttggacttaattggacgagctcaacgacttctgagttctactacttctgaccaataggcgcatcgaatcgagacc 720  
atccgatccaatctcatccacgcacacaactcaagtatacagagaaccaaagatcaaaataaaaaaaaatccccacggg 800  
ctcttgggttgggttggctcgagctcgaggtctcgctgagtcgctctccctcccgagctctctctctctctctct 880  
ctctctctctctgctctcgcaaaaacctagccacctccccctccaccacATGCACCGCGGGCGGACCGCTCCACC 960  
GACCCCTCCTCCGGCCCGCCCGGTTCTCGCGGGCGGGGACGGCCGATTCGGCCGCGGCCCTTCTCGCTGGTCGTC 1040  
CGGCGGTGGCGGGCGGTAGCGGCAGCCACCCACCGCTTCTCCCGTGGTGGGGTGGGGCGGGCGCAGGTGGCG 1120  
GAGGCGGAGGTGGAGGCGGAGGTTCCACCCGTACCGTGGCCCGTCGGACCACTCCGGCGGGGAGGCTACAGAAGCGGC 1200  
GGCGGGCGGAGTACGGGAGCGGGTAGCGGGCCGAGACACCGCTACGGCAGTGGCCGTGGTACCCTACAGgtttgtg 1280  
ccagatatacggcctgggatactttaggtttcccagactatcttaggatgggactgcttacacgtgacgaggtg 1360  
tttgggtcagatttgaaccttagcttatgataaaaaatcttagtaaaccaactttactgtggatgttggaaaacc 1440  
taagcaattaatatcgcagtgaggatcttgcagaaatcgcactgcacacaggtgtacagttccattataggctct 1520  
gacgtatgactagatggcaaaagccaccactaacctttttgcatggaggacacctttgatgggttttagtctgtag 1600  
agaattgtttacttataaacatggcctaatgggtgcaggagggttaggaaatcgtctgcttctgaaacttagaggtctg 1680  
tttattctaggttcagcatcagttatagcatgttcagctaaactttctgtttatataactatttagtctttttcc 1760  
agttcaaaagcacaacaggccaatgtaggatgtgatagtatgaatgaatacaatgctctagagcatctcgatgactg 1840  
tttattcaagtgggctcactggagaattatttagagcttatgtttacacctttctatctgcaaaatagattacat 1920  
ctaattttccggtcagATCATGATAACAGAAACAATACTATGTTAACTTTTTATTGGGTCAAGTTCAGGACAGCGACTG 2000  
AGGATGATgtgaggtgtacacttacaccacttgatgtgtatctgctttctgctcttagttaaactctttatgtctgct 2080  
ttcaatttgtatctctgectgactataatctgtattttaggttgggtttatcgtagctatcgctgtatctgaaacaat 2160  
ccgtaggcttaatgcttacaagtctacaagttggcttagaagaataataaataaggcatctatgttggcaaaaatca 2240  
tctaaagaactatctacgttagagaaaaagctcacttagaaactagctgaagctaccttttgcctatgcttagttcg 2320  
ggttatctgactcactatccattataagttaataaggatgggttaccatttaattgttgggttactactttagtttggc 2400  
actcttttggctctctatttctctttagctatccagtttgaagaactttctctttctcagGTACGTCCTTT 2480  
ATTGAGGAGCATGGAGATGTTGTTGAAGTTGCTTTGATCAAGGATAGGAAGACTGGTGAACGCAAGgtacggcaaac 2560  
tttttcttaataatatacaagttctgtatctcttcttccagttctgagagttactaggagcaacgaggttgc 2640  
tcttctcagttagatttggccaagtttgaactcaatttaccgcgcttccatctggttctctctggttgggtcagtt 2720  
agaggaagagaatggaagcaataactgttctgctgactgtatctgaactggatattctgactgctgctagacaaag 2800  
tagcagattcagtagcagcaacttctgtagtcaacatctgttgaaaaactttgcatccatttcttttgaatgtgct 2880  
gcaaaagaacagggaaactttttagaatacagacaaactttcalcattttctgttccatggatccagatttgtta 2960  
ttctagcatcgtcaatttctctgtatggaaatccgttgggtatgagtgatgaacctttgatttgtgagttgggttctggt 3040  
tggatgggtgactgtagttgtcctgactaatcaactgggtgctatacttttgttggtttagtgttcagaaatcatgg 3120  
gtgcttgttggagcagttactaatctagagtttgggtggatggcagattaatgctatttgtttagttcagctatcaatt 3200  
ttaccatgagttggcggccttctgggttatctgaaataaataatgatacctgtgagttctgggttggttgttggat 3280  
tgcactatgcaatttatggatgcttgggcatgacaactttttatctgtagcatttagtggaatgtatgtttgca 3360  
gacagagttgcatctactgggttggatgggtcactcagatgggtacttggcatttggatgaaatatactataaagtcaat 3440  
ctccaacagcttttctgttggatgtgtagcagcttctctgtttaggttgaacctgtattttagaataatggcactgctg 3520  
gtatcacttccagtagcagatataatggccttggctttttagatgattcagccattctgggttctttagcctgggacttggc 3600  
accaaaaaattaggtcgactttttagaacttacctttatagatgggtgagatgataatagcaatgcgtactgca 3680  
ccatgtgtttatagtagctcacttctgtttatgtatttcatttgggttaacttctcactccgattttttactca 3760  
gatctatgatacattctgttatatggcgtactaaagatttaggtcagaatacccaaaatcagattatgtggca 3840  
tggaaatttaggttagtctgggaaaaagcccttgcacttgaactgtggtgctgggtatttttttgggaaatgattgg 3920  
atgagcatttgttttaccatcagttgaagttgaactctgattctagaccggtttatattataatagctatctgggt 4000  
tatgaccacactccagcatttggagttaggaggtcgcgaaggcatcgtacctgagatgtgctgttggatataatttt 4080  
gtttatgcccagcacttgggtggcatctttaaattgtgctccatcagttatgagtagcaggttatgctcatattta 4160  
ttgttagagagaggtgactatgagttcaacatgtagcacttatcttggtagcagctgtagctggcttggatgataat 4240  
tgaatggaactataggttagttggatcaattatgccagttgctaatcagaatctgagtgcatcgacatttggatctaa 4320  
ggctggctcatattatcagatgcaaatgggtctcccttttggtaacctttgaagatttttggttatcctgctat 4400  
taatgggtacatgagcttcttctactgttaccacaattttctgcaattgctgtgaccacatgataatctactgtgaa 4480  
ctgctgtctgtatgcatcttctggagttaggattgattatagttgctgtatggaagttggaaccaggcacacctgt 4560  
ttcttttatcagagcaaaacactttatgtttgttctagttatggtaacataagttgtagatgcaagctgttactga 4640  
aattttaatggaatagcagtcagttggagcatcgcgaaagaacttaattgttcatacatagccgtaaatcttcttgc 4720  
atgaatttggcagttgcacagtttagtctaaatatttggacatgcaatatacaaatagttatattttaaact 4800  
tattacttttaataaggctttatgcttctgcttgaatggatttctgattggtgggagtagtattgttcatc 4880  
ttcaatgtcaagattggaattggagttgcaatttccacgacctttcaaaataatgcgccacctttctatcctgctttg 4960

gctaacctctgctatgtttctctcatatacatgatcattgtgaaacatcacagaaaatgcaacggcttgtgatcaaatcga 5040  
tatgctcatatgtgagGTGTGTTTGGTAATATGCTACTTCTGAAGAGGCTGAGCGAGCCATCAGAGCTTCCACA 5120  
ACCAGTACACTTTACCTGGGtaactaatctcttgttgtgtactcattatagtcagctctttgtctgtaagactcttg 5200  
aatatgtactgtgtatctctttctgtcagGCAATGGGCCCTATTCAGTCAGATATGCTGATGGTGAAGGGAACGCC 5280  
ATGgtactaatagatattttgttatcagtgaggctattggactttagaacaatgctgggataggatcaatgtatagc 5360  
atagctccaccataacttctatgggtgataaatcgtactgttcccttttaggctaaacaaaaatattagtgagtgaa 5440  
atagttgactgttaataagaaatctacttcttcaactatatttctttatgtacttattgggtggttctcaactt 5520  
ttcatctatttgttagGGCTATTGAGCACAAGCTGTTTGTGCGATCACTCAATAAGCAAGCTACTGCGAAGGAGATTGA 5600  
AGAGgttaagggtctgttgttcaaaagaaggatagtagatttagaactcatctccaagaccaatgtgaaatttgcat 5680  
tgctttttgatgcttattatgaactcatcttttaagttaagaagcatatcaagtagatataaatcaaatttgtg 5760  
tctgggttattttgttagATTTGCGCCGTATGGTCATGTGGAAGATGTCTACATTATGAAGATGGCATGAGGCAGAGC 5840  
CGAGgtctgtcatataacttggatgatttgcagttatttttttcccttacaacacatgtgtgtaacatagcaaaat 5920  
caagGTTGTGGCTTTGTCAAATTCATACAGGAGACCGGCTCTTGACAGATGACTGCTCTGAGTGGGAATTATGTAAT 6000  
GAGGgttaagttctgttagctgagttcttacttctgaaatattataatataatcattatgttgtgttagGGGTGC 6080  
GAGCAACCATTAATAATTCGGTTGCTGATGATCAAGACCTAGACCTGAGAGAAATCAAGgtggctcaactttcacctat 6160  
gttttcttggctgatacctccatgctaatctaggttcagcacatgttttatattttatacctagataaatcaaatgtct 6240  
ccgtttccagtaaatactgatgtctgaattgtctttgttagGGTGGTCTGCAATTGGAGGTCCTGGTTTCAGTCCA 6320  
CGATCTGATGACGCTCTGTTATCAGgtttgggtacccttcatgaaacagctacttttaagattggagaataatgtt 6400  
aaatgcaagtgaaaatagttgcaaatagttgccccctcagcctgttcaactgattttgaggcttgcattttg 6480  
caagtacaatattatgctcacaaggctagtaaatgaaaacgtccatataaactttgatcagtagtccatccaacaaa 6560  
ccgaacaataaacagggtattttgacacccatccaacaaatagttccaatttatccatccctcagtagttttctaat 6640  
aaacagtgcgggcatataaccttgttccatatttttcccttttgatgactgtctttgttagtactatataaactgattc 6720  
ttgcttgagaatagttagaactgaaactgagctacttttctatccagGCCAGCCGCAACCTTGATGAACCAAGGGGT 6800  
CGGCATATGCCCTCCTGACTCTTGGCATCCATCAAGCCAAAGGTCAGCACCTCATAGTTAATAACTTTGGATCGACAA 6880  
TCCTATGGCTCCGAAAGGGAGTACTGTTACATCAACCAACAGATACGgtatgggttcaaatcaactttttatgacagt 6960  
caattctgtttgcttccatttcttacccttggatctgcaatataagGCCACTTTTCGACCTCAGATGTTTCAGCGGAA 7040  
ATGGCTCTTTGCAAGCCAAACAGCTGTGCCAAGTTCGTCACATATGgttaactgggatattcagacttttctgtctc 7120  
aatagcttttagatggaaaatctgggttaaacatcatgatacctttactttgttagGGCATGAACCTCCTCCCATGGC 7200  
AAGGCCATCATCTGGGAGGCCAGCAGATCCACCTTTGCAAAAGTACCAGGGTGCCTCAGAATTTCCCTGTTCAATTG 7280  
CAGAATAATCAAGCTGGGCAACCCCTTGACGGTCTGCTCAACAGATTGGTCAGCTTCAAGTTCCCAACTCTATGGGTCC 7360  
TGGTCTTTTGGCCAGAATAGGTTATCTGGTCAGCTTCTGTGTACAGCCGTTGATGCAACAAAATGCTTCCGTCAGCG 7440  
CTGTGACAGTGCCTTACGCCGTGTCCAATTCATGCAAGCTATTCGCCGGCAACAGCATCTTCCCTCAAATGTTGACCA 7520  
CAAATGCTTCAGCAGCAGTGCAGCAGATGCCATCGCAAGCACCACAATTGCTACTCCAACAGCAAGCTGCTTTGCAATC 7600  
CAGTTATCAATCTTACAGCAGGCAATTTATCAGCTTCAACAAACAGCTGCAACTAATGAGCAGCAGCAGCAATCGAATC 7680  
TAAACCATCAACAACCCACACAGgtcgtgagcaacatgtattttctatgcataccaatgtgtacgggttgtgttt 7760  
agttgtataatgtgggtttacggctgacatttttttaccgtttctgtttccactacagGGTCAGCCAGTCAATCTAGT 7840  
AACCTGGTGCCTCAATTTCCATCAAACTTAATACAATTCGCCAGGCTACTTCACTGCAGTTCCTTT 7920  
AACCTGCAATTTGAGCTGAACTAGCTCTCTGAAAGTTTTAAATACTACTACAATAGCATAACTCGAGAGAGTAAGgtg 8000  
agaattgaaactcatccaatcattttaagatcgcaacatttgggtctcactcttagagtattgttttacagTGG 8080  
GATAAGCCTGAAGAGTATGTGCTGTATGAGCAACAGCAACAGCAGCAGCAACAGCAGAACTACTTTTGTCTCAACAGCA 8160  
CCAACAAAACCTGCCATGCAAGCAACTCAGTCAACCTCAGGCTCAGACACATCCAGCAATGCAACCTGTCCAACAAA 8240  
TTCCTCAGGCACAACAGGACAGCAACAAATGCAGATGAAACAGCAGgtgcacatgctgttccctgagctataatctaa 8320  
tatgacatctactattgatccagcttcgcatgatctatcttctctctcttcttcttcttcttcttcttcttcttct 8400  
cattaagagatccctttctgttctttagtcttgtcaaaccaagaaaaatctctaatgaatgttctacctagcact 8480  
gtgtttcaagtacatgtccttctctatgtattcaaacctttatttttctcaactttgatttgatcttcttcttct 8560  
tatcagcacttttgacagctcaggttgtatccgcttcaagagacaaaaactctttgttgaatataatgacttgaaacac 8640  
tgtataatagcgataaaaattgaaatgaacttactgttgagatttcaacttccctgctcttcaactcaatttgaagt 8720  
gttaagtgtgtaagattgaaactttacatctcaaacattttatagGAATTGAATTATACTCAGCTACAGACTCCTG 8800  
GTGCTATTGATCCAGTAGGATACAACAGgtactattcaacttacttttggttctcaatagttgatcttagattctt 8880  
atgtatattcaattcaacagaatatactcggtaaacatttagGGCATCCAATCTGCACAAGAACGTGCTTGGAAAAGT 8960  
TGAgtcgaaggtgagaaaaatccctacctccctcagtaggcatctttgtgaaactatagaagtaaacaccagtg 9040  
ccatttcatgttgttggaaatgcagtgcaagaaaaatgattttttttgggttgtaaaacaacagtggtttttgaaac 9120  
tgtatgcttcaactgtaatgagaaactgctcatgtttaaagggtgacctgaatcaaatctttacatgcgatgctga 9200  
gatacagatagttttattgacgagaagtagagaacttgagggattttagtctttagatccattttctagcagattttt 9280  
tttcttaaaaagcaatgagataatgctgttgtgttatcggacggaccagcgtgactgacacatgattaaactgttac 9360  
tctttttttcaggtgaatgataaattggtaagctgttactcggaaatgagctccactcaactgctgcctccatcaaat 9440  
gccttgacggctgctgatgctgagtggtggccaagcgccatgccgatcgtgttaactctggaatagcttagatgat 9520  
gtctaaaaagttgtagctccaatccgtgtaaaatgtttgagctctaggccttaccgctgtaaacattctgctgatag 9600  
aatgttctgttcttctgcataggcaactgcccagaggttcgtcgctagtagattttgggcatttcatgacatgtcccag 9680  
caatcatcatttagattgtttctcctttgaaagctgtttgctctcaagacatgctagataagaatagattggccgagg 9760  
cgggaatcagcatgtttgctcctcccactacaatggccgaccgacgtgggcatttctcacatcgatagaacatggt 9840  
tatcttggagtagactcttataagcccttaccattggacaatgatgtgacgtcagctccaagatttttgatagacta 9920

```

aactggagacgtatgtgcaacgttttaagatacgaattgagatataaacaaaaattcacggatataaacaaaagaggga 10000
gaacacttttttttggacaatgcaggagaaaagtacaggattataaaagccacaatgatacatatctgggccctgt 10080
agctaagctgtaccttttttaaatcaagaccacctagagcagcaggaagttacacctaccaggtaggaatgcataagaag 10160
agttgaaataacacatcttgaatttcttctcaaactgtccgacgcgacaagccattaattaactaacattgggtgtgat 10240
tatgcattgcaaaactcatttagtcaaactttcaaaagaatgaaaatttatgcgttctgttgtgtcgtgtaacaccagatt 10320
ttatgcccaaaattgccaggcatgatgtacggaagcaaacctggcgataaactatctaccatgaaagagaccaacaag 10400
ggccccgggttaaacagtttgcttgalcaataatgatgtccaataatagaagatggaaagctgatgcatttcgaagcct 10480
tctccatacaaaagtacaaccacttgttttgagtggcacgtggttctctcatctgtggacagagaggcaattttggagt 10560
gatcattatgcaagtaaatcattttagatgggtgat tacaccagtataatataatcttgaagaaaaggccacgtatgt 10640
ttggttggttcatgcggatcacgtatctagcttagattggtgctaaatctatactttgtaaaaattacaagctt 10716

```

그림 26. 벼 FCA 유전자의 염기서열. 이 유전자는 16개의 인트론을 가지고 있으며, open reading frame은 8030개의 뉴클레오티드로 구성되었다. 엑손은 대문자로 표시하였고, 인트론은 소문자로 표시하였으며 모두 다 GT로 시작하여 AG로 끝났다.

## 벼 *FCA* 유전자의 구조

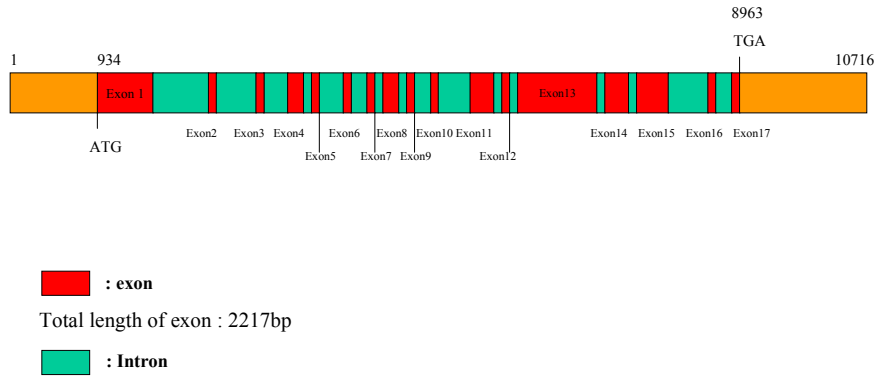


그림 27. *FCA* genomic DNA의 ORF상에서의 exon과 intron의 위치



고밀도 분자유전자 지도 작성에 이용하고 있는 Recombinant Inbred 유전집단인 밀양23호/기호벼 F13집단 164계통을 활용하여 FCA 유전자의 벼 염색체상의 위치를 분석하였다. FCA 유전자를 탐침으로 하여 벼 genomic DNA를 8개의 제한효소(XbaI, EcoRI, VspI, BamHI, DraI, HindIII, BstOI등을 이용하여 Southern 분석을 수행하여 유전자 분리집단에서의 분리 성적을 조사하여 분자유전자지도상에 유전자지도를 작성한 결과 벼 9번 염색체의 상부에 FCA 유전자가 위치하는 것으로 분석되었다(그림 28).

다. 벼 FCA cDNA, CO-like cDNA 및 Hd1 genomic DNA 유전자의 형질전환 벡터 구축

#### 1) 벼 FCA cDNA의 형질전환 벡터 구축

벼 FCA cDNA는 전체 2521bp로 구성되어 있으며 738개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하는 유전자이다. 벼의 FCA cDNA가 삽입되어있는 pBluescript 플라스미드 (pFCA)로부터 제한효소 XbaI과 KpnI으로 FCA cDNA를 절단해 내어 pUC plasmid에 35S promoter와 nos terminator가 삽입된 플라스미드(pUCPT)의 동일한 제한효소 자리에 삽입하여 pPFT (P35S::FCA::Tnos)를 만들었다. pPFT를 HindIII로 처리한 후, EcoRI으로 부분 절단하여 약 3.3 kb (P35S::FCA::Tnos)를 분리하였다. 이것을 HindIII와 EcoRI으로 처리된 식물형질전환 vector pCAMBIA3300에 construct를 하기 위하여 selection marker인 phosphinothricin acetyl transferase gene(bar)가 있고, 그리고 FCA cDNA가 sense 방향으로 삽입시켜 식물발현벡터 pB2PFT를 만들었다(그림 29). FCA cDNA가 pCAMBIA3300에 삽입된 것을 EcoRI과 HindIII로 절단하여 전기영동을 하여 확인하였다(그림 30).

#### 2) CO-like 유전자의 형질전환 벡터 구축

CO-like 구조유전자를 증폭하기 위하여 primer1 (5'-ATGCTGAAGTTGG-AGC-3')과 primer2 (5'-CTAGAACGTGGGCACG-3')를 제작하였고 95°C 1

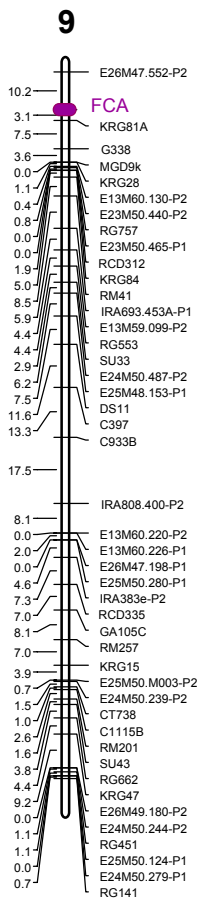
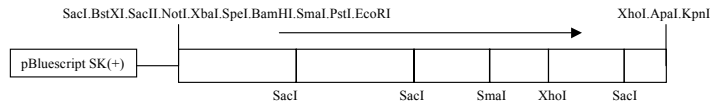
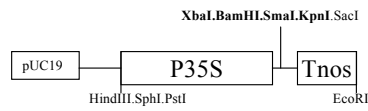


그림 28. FCA 유전자의 염색체 상의 위치

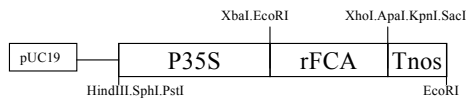
pFCA



pUCPT



pPFT : pFCA/XbaI.KpnI → FCA + pUCPT/XbaI.KpnI



pB2PFT : pPFT/HindIII.EcoRI(partial digestion) → P35S::FCA::Tnos + pCAMBIA3300/HindIII.EcoRI

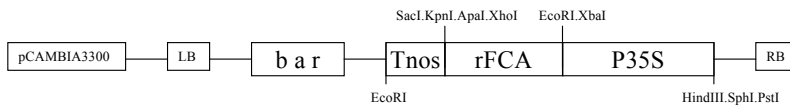


그림 29. 벼 FCA cDNA의 형질전환벡터(pB2PFT) 구축

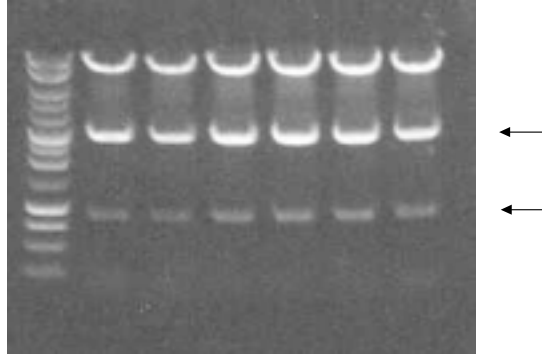


그림 30. pCAMBIA3300에 삽입된 FCA cDNA의 전기영동상에서의 확인.  
위의 화살표가 35S promoter 아래의 화살표가 FCA 유전자이다.

M CO-like gene

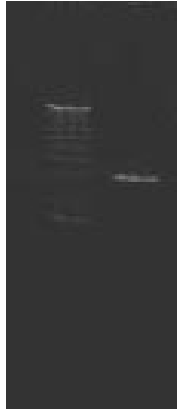


그림 31. PCR을 통한 CO-like 유전자의 증폭 확인. M:size marker

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

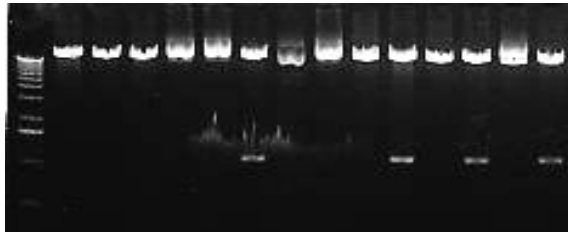


그림 32. CO-like 유전자의 형질전환백터 구축결과. M: size marker, 1 -14: plasmid DNA를 제한효소 Not I으로 처리한 후의 결과

분, 58°C 1분, 72°C 2분의 반응을 30회 반복한 후 1 % agarose gel 전기영동으로 분석한 결과 약 1 kb의 단편이 증폭됨을 확인하였다 (그림 31).

삽입단편이 확인된 plasmid는 염기서열 분석으로 목적유전자임을 확인한 후 pMJU vector에 클로닝하여 유전자를 확인하였다 (그림 32). 제한효소처리로 삽입된 유전자의 방향성을 확인한 결과 순방향 및 역방향으로 삽입된 클론을 확보하였다. 그림 16의 10번이 유전자가 순방향(pMJU-CO10)으로 삽입되었고 12번이 역방향(pMJU-CO12)으로 삽입되었음이 확인되었다.

CO-like 유전자는 ubiquitin promoter에 의하여 발현이 조절되게 구성되었고 조직배양 과정에서의 형질전환체의 선발을 위하여 제초제 저항성 bar 유전자가 CaMV 35S promoter에 의하여 조절되게 하였다 (그림 33).

### 3) Hd1 유전자의 형질전환벡터 구축

일본 국립농업생물학연구소에 근무하는 Masahiro Yano 박사로부터 벼의 Hd1 유전자를 함유하는 ApaI로 처리된 genomic DNA(7.1kb) 단편이 삽입된 plasmid pZPHd1를 분양받았다. Hd1 구조유전자(그림 34)는 hdlup primer (5'-ATGAATTATAATTTTGGTGG)와 hldn primer (5'-TCAGA-ACCATGGAACAGT)를 이용하였고 hd1 genomic DNA 단편을 갖고있는 pZPHd1(G)를 template DNA로 사용하여 PCR 증폭하였다. 증폭된 단편을 1 % agarose gel 상에서 gel elution하여 pGEM-Teasy vector에 클로닝하고 PCR 단편이 삽입되었음을 확인하였다(그림 35). pGEM-Teasy vector에 삽입된 Hd1 구조유전자는 NotI으로 처리하여 NotI 단편을 pMJU 벡터에 삽입하였다 (그림 36).

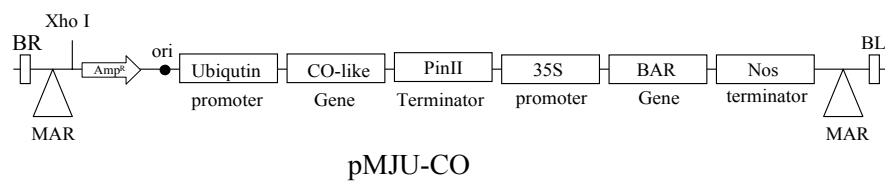


그림 33. Co-like 유전자의 형질전환백터 유전자지도.



aaagcaaatgaacagaggaggactgttctccttacaatatttgcaaaaaaaaaagtagattctctatggagaggca 80  
tatttaacgttatagcagggtat aat aagaaacagatggct caaagaaatgataagcaacaataacccat aaaggac 160  
ccatgtcatatagataggccttgcaacaacaaaaaaaggtagcaaggaataatagttccttcagcagttgaga 240  
aatcatataacagaagaaaaaacacattggtaataat ttgacttctccactagaatagatattttggatgagggagg 320  
ccggcaagaaactatttagtgacatggcaggccgctttggaacttttctcatgtatctgcaactggctacctcacaccgg 400  
aggttcgtaaaggcggacggctaaaggggagtgccaatgactggcacaaccgcatgctttggaatcccagagaacc 480  
aacctccctttctcttttgcaaaagaatgtgcataaaagagagaggcagcatcttctctgctctttttgttttc 520  
cctttatttgatcatcacagtggttccaattctccccctttgggcttagttccatctaagagatgtccattgaatt 600  
ggttagggacaacttaggaatgcatatgggaggatctattgatccctgtaaaatctcttagggacagtcctaaagtt 720  
aaatggaacatgatagcacaagagaatcagtgactcatcactaaaatgcaaaagctttttgcgcaaaagcgcat 800  
gctttggcttaaaaggtattgacatcagttcaggttagatacttagatttagctcaagggcgccaattctccataggacc 880  
cgccaaagtgcacaaaactttatctgaaaacgaccctccatgaggattggcatcagggggtgagaagagaacgctg 960  
aagcagcaaacatccaaaggcaaccacaagacaggcatgagccgcccgtcgccccccccccccccccggggatc 1040  
gcccgaagtgtcaatcgctggattcgacttgacaccccttactattagtagtactctacactcaaacccccaggacaaa 1120  
aacaccgtgactttccccctcctagctccttccaaaaaacacacaaaatccacaagaccatgagagtagaggaaac 1200  
aggagaagacgcatcacacacgacacatagagagagaggacaaacacaatagctggatcgatagacttgtccatgtgg 1280  
tgcaagctaaagctactactaccacaagcaagctacttcgttcATGAATTATAATTTGGTGGCAACGTGTCGACCAG 1360  
GAGGTTGGAGTTGGAGGCGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGGGAGCGGCTGCCATGGGCGCGGCCGTGCGACGGGTGCCG 1340  
CGCGGCGCGAGCGTGTTGTACTGCCGCGGACGCGCGGTACCTGTGCGCGTGTGCGACGCGCGGGTGACGCGGCCA 1520  
ACCGCGTGGCGTCCCGCCACGAGCGGTGCGGGTGTGCGAGGCTGCGAGCGCGCCCGCGCGTTCGCGTCCGCGCC 1600  
GACGCGCGCGTGTGCGTGGCGTGACGTGCAGGTGCACTCCGGAACCGCTCCCGCCATCACCATCCCGGCCAC 1680  
CTCCGTCTCGTGAGGCGGTGGTGGCCACCGCACCGTCTCGGCGACAAGGACGAGGAGGTGGACTCTTGGCTTCTCC 1760  
TCTCCAAAGATTCCGACAACAACAACAATAACAACAACAACGACAACGACAATAACGACAACAACAACAGCAACAGC 1840  
AGCAACAACCGCATGATTTTTGGTGAAGTCGATGAGTACTTTGATCTTGTGCGGTACAATTCGTACTACGACAACCGCAT 1920  
CGAAAAACAACCAAGATCGGCAGTATGGATGATGAACAGCAAGAGCAGCAGCAGCAGCAGGAGATGCAAAAGGAGT 2000  
TTGAGAGAAGGAAGGAGCGAGTGTGTGGTACCTTACAGATCACAATGCTGAGTGAGCAGCAGCATAGTGGTTATGGA 2080  
GTTGTGGGAGCAGACCAGGCCCTCCATGACCGCGCGTCACTGCTTACACAGATTCCATCAGCAACAGCgtgagttc 2160  
atctattactagctgcaactatttttttcagagaatgaacatctattactgttgttagttagttgttactacatgcca 2240  
cgttgtcaatgttttagagttcatactagttacttttagtggaacaaatctccaaacaaaagctactgtctaacaaaa 2320  
tgaaggatataaataacagatctcaacaagaaaacaaagatactttctacttccaagctcgatctttaggctgataa 2400  
atggaaccgataaaaaaaaaactttaagaaaagtacacaattgatctttaggcagaccagttgactacttctgtattt 2480  
ctaagcatatacgatccatgtaactcaactaatgaaaagaagtgagttgttaaccttttatgtacacagcaatcacca 2560  
cacgaaagacctcatgaaaagtaggataagtgtaagtgaattcatattttatcccagtgcaataattaaaaatctta 2640  
cttttgcgacagtaaaaaagatattggaagttttcttatgtatgtaaaataaataagccatctatatacatgca 2720  
gggtctctgacacctgcaatctccttatgattcgeatatttcagtgaccatttgccgattccatctcagATATCTTCTC 2800  
ATCAATGGAGGCGGTATAGTACCAGACAGCAGGTGATAGATATGCCAAATCCAGAATCCTGACACCTGCTGGAGCAA 2880  
TCAATCTCTTCTCAGGTCCTCGTTCCAGATGTCCCTTCACTTCAGTCCATGGACAGGGAGGCCAGGGTGCTCAGGTAC 2960  
AGGAGAAGAAGAAGGCCAGGAAGTTTGAAGAACAATACGTTATGAAACAAGAAAGGCGTATGCAGAGCACGACCCCG 3040

GATCAAGGGCCGTTTCGCCAAGAGATCAGATGTGCAGATCGAAGTGGACCAGATGTTCTCCACTGCAGCTCTATCTGACG 3120  
 GTAGCTATGGTACTGTTCCATGGTCTGAt gggact cat gagacgct at ct t at aggcata at at ggggact tact gag 3200  
 tagcaataacatcgatccagtgggagt agt tctagacaatctgtgtatgaataaatagtgtgtgtttgcgacttaaaat 3280  
 tgatcaagtaccttagctttttaaagttttgctttgtaatttccggatagcagat at at tgttggacttgctcagta 3360  
 gctttaagttttgaagtaagcaagagcagtgatgagatgaaatgagtatgtgataaactgtat at agataat tctagg 3440  
 gtaccttggccaacaatcacagt agcaacaatgcttttaggggttttaggtgacgaat tgggggttttagttgtttactatga 3520  
 agtagcaccaaaatgggtggaacat at at ttcctat tttcgttccatcatgacat at aactgctgtctaaccagcctatg 3600  
 ttgactgaaaaaaaagctcgtttcat tacaataaaaagatggaaccctgat taagtgtgtccactggccagat agt at c 3680  
 atagt agtataataatgaactggagttcaagctctttatattccacttggatctcggtgccat tttcttaatgatgtatc 3760  
 tttagtgatgggctatcatgtatccggttggaatttcagcagaggtgaaggtgatgggttctactcagcttttaaatatc 3840  
 cattattcttacagccctccagatcat tctggatgaaaagaaaagcagtgacaaagaatttactgtt gctttaacctga 3920  
 gaatcatatctttccagcacggcctatcttctcactaaacctgagctatcgggtgatcagtaactcgaatgat agt t g t a 4000  
 gggaaat at aggaacat tgcct gat act gat aggtacaccat t g t g g t g g g t g a t a a g t a c a c a a a c t c a c a g a a a a 4080  
 g t t t c c c t a t t a t t t g t g a a t c a a g a g a g c a t a a a t a a g g a a g c t c t t t c a t t c t c a g t g c a t t c c t t c c c t t t c 4160  
 a c t a g c a a c t a g t g g c a t g g a t c t t a t t g c c t t t g t t t g a g a t g g a g c a t t c a c c a a a t a t c t a a g g c a t c t c a g g g c 4240  
 a c c a a c c g c a t a t a c a g g a a t a c a g g a t a c a t c t a a t c g t t t t g g c t a a g c t g a c t g t a t c g g t t a g a t a t g c a c a a 4320  
 a a a a c a g a g t t a g g a a t t a a g c c t a a g a g a t g g t a a t t g g a a c t g g a a g t g a a c t t t t c a t t t c a a a t a t c a c a a a 4400  
 g a g a g t c a a a a a g t a a a g t g a a a t a a a g c a c a c g g g a g a t a c a g a t c c a t a t t t t g a c c g a a a c t g a c g a c a t a t a c c 4480  
 a c t c t a g t a t g g a t a g a g a g a a c a a a t c a a a g t t c t g c a g a a g a t a a a a c t a g a c a t a g t t g a c t a g t a a c a g a a g a g a t 4560  
 t c c t g a a c t t t c t c a c t g a a a c t a t c a g c a a a t a g a t a a a a c t c g t g g t g a t a t t t c a t c c a c a t c a g c a c t g a g a a c a 4640  
 g a a c a g c a a g c a a g c a g t t t g a t t g t g a t g g a g g g a g c t c c t a g c a c a t c a t c a t a t a t g a a g t a a t a t t a a t a a t c a 4720  
 t g g a a g t a t g a t g a a g g t a t t t t c t g g c a a c a g t t c t t g t t g a t g c a t c a g a a t a c c t g a t t a a c g t g g a a t t a a t c a 4800  
 a g c a t c a g a a t c c a 4814

그림 34. 벼의 Hd1 유전자 염기서열. 단백질 암호화 지역은 대문자로 표시하였다.



그림 35. Hd1 유전자의 pGEM-Teasy 벡터로의 삽입 확인.

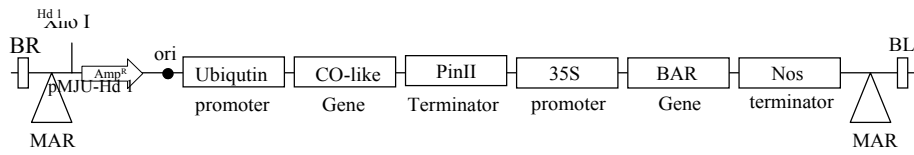


그림 36. Hd1 유전자의 pMJU 형질전환벡터로의 구축

#### 라. FCA 형질전환체(T<sub>0</sub>) 획득 및 후대

FCA cDNA를 삽입한 형질전환벡터(pB2PFT)를 함유한 *Agrobacterium* LBA4404 strain를 이용하여 낙동벼 캘루스에 형질전환 시킨 후 Phosphinothricin이 3ppm 함유된 배지에 치상하여 재분화 시킨 후 온실에 68개체의 재분화 식물체를 이식하였다. 이 식물체에 Basta 제초제(0.5%)를 살포하여 47개체가 저항성을 나타내었다 (표7). 표7에서 보는 바와 같이 재분화 식물체중에서 Basta 제초제에 감수성을 나타내는 식물체가 있었는데 이것은 도입된 유전자가 발현이 안되었거나 유전자가 도입되지 않은 개체가 재분화 된 것으로 사료된다. FCA 형질전환체(T<sub>0</sub>)중에서 47개체로부터 종자를 수확하여 개체당 각각 4-5종자를 파종한 후 1 개월이 경과한 후 Basta(0.5%) 제초제를 살포하여 제초제 저항성을 조사하였다(표2). 표2에서 보는바와 같이 T<sub>1</sub> 세대에서의 제초제 저항성에 대한 반응이 개체마다 다른 것으로 나타났다. 어떤 개체는 5개 종자 유래 식물체가 모두가 Basta에 저항성을 보였지만 어떤 개체에서 유래된 종자에서는 일부 식물체만이 Basta에 저항성을 보였다. 이것은 Basta 저항성 개체에서 후대(T<sub>1</sub>세대)로 이어지면서 삽입된 유전자의 유전적 분리에 기인한 것으로 사료된다.

#### 6. FCA 형질전환체의 조기개화여부 및 기타 농업형질 조사

FCA 전환체로 사료되는 종자(T<sub>1</sub>)를 각 계통별로 충실한 종자를 선별하여 2002년 5월6일 종자소독 한후 최아시켜 5월 11일 온실에 파종하였다. 온실에서 4주간 키운후 6월 8일에 농업생명공학연구원의 GMO 포장에 이식하였다. 조생종인 운두벼와 소백벼 그리고 낙동벼와 일품벼를 함께 파종하여 출수기 및 다른 특성을 비교해보았다(표8과 표9).

표 7. 낙동벼의 재분화율 및 형질전환 효율

| 치상 종자수 | 공동배양한<br>캘루스수 | 제조제 저항성<br>캘루스수 | 재분화<br>식물체 수 | Basta 저항성<br>형질전환체수 |
|--------|---------------|-----------------|--------------|---------------------|
| 1764   | 1395          | 585             | 68 (5%)      | 47 (3.3%)           |

표8. FCA 형질전환체(T2)의 Basta 처리 반응

| 전환체(T1)<br>번호 | Basta<br>처리한<br>유묘 | Basta 저항성<br>개체수 | 전환체(T1)<br>번호 | Basta<br>처리한<br>유묘 | Basta<br>저항성<br>개체수 |
|---------------|--------------------|------------------|---------------|--------------------|---------------------|
| 1             | 5                  | 2                | 25            | 5                  | 4                   |
| 2             | 5                  | 1                | 26            | 5                  | 5                   |
| 3             | 5                  | 2                | 27            | 5                  | 5                   |
| 4             | 5                  | 2                | 28            | 5                  | 5                   |
| 5             | 5                  | 2                | 29            | 5                  | 4                   |
| 6             | 5                  | 2                | 30            | 5                  | 4                   |
| 7             | 5                  | 3                | 31            | 5                  | 2                   |
| 8             | 5                  | 4                | 32            | 5                  | 1                   |
| 9             | 5                  | 3                | 33            | 5                  | 2                   |
| 10            | 5                  | 2                | 34            | 5                  | 4                   |
| 11            | 4                  | 2                | 35            | 5                  | 4                   |
| 12            | 4                  | 2                | 36            | 5                  | 3                   |
| 13            | 5                  | 4                | 37            | 5                  | 2                   |
| 14            | 5                  | 2                | 38            | 5                  | 1                   |
| 15            | 5                  | 3                | 39            | 5                  | 0                   |
| 16            | 5                  | 2                | 40            | 5                  | 1                   |
| 17            | 5                  | 4                | 41            | 5                  | 2                   |
| 18            | 5                  | 1                | 42            | 5                  | 2                   |
| 19            | 5                  | 1                | 43            | 5                  | 3                   |
| 20            | 5                  | 3                | 44            | 5                  | 3                   |
| 21            | 5                  | 4                | 45            | 5                  | 4                   |
| 22            | 5                  | 4                | 46            | 5                  | 4                   |
| 23            | 5                  | 2                | 47            | 5                  | 5                   |
| 24            | 5                  | 5                |               |                    |                     |

표 9. 온실에서서의 FCA 전환체(T2)의 특성

| 개체명       | 출수일  | 간장   | 수장   | 주당<br>수수 | 수당<br>입수 | 정수/<br>총갯수 | 천립중   | 등숙률<br>(임실률) |
|-----------|------|------|------|----------|----------|------------|-------|--------------|
| FCA46-1-1 | 8/23 | 64.5 | 12.5 | 13       | 66.46    | 669/864    | 20.98 | 77           |
| FCA46-1-2 | 8/29 | 42   | 17.5 | 3        | 50       | 6/150      | 12.00 | 4            |
| FCA10-1-1 | 8/28 | 70   | 18   | 13       | 79.46    | 550/1033   | 21.91 | 53           |
| FCA10-1-2 | 8/28 | 69   | 16   | 14       | 83.93    | 605/1175   | 22.60 | 51           |
| FCA16-1   | 8/17 | 65   | 16.5 | 7        | 43.71    | 242/306    | 20.29 | 79           |
| FCA16-2   | 8/17 | 62   | 17.5 | 9        | 45.67    | 337/411    | 19.60 | 82           |
| FCA18-1   | 8/16 | 62.5 | 12   | 20       | 36.9     | 572/738    | 18.55 | 78           |
| FCA18-2   | 8/15 | 63   | 21   | 11       | 43.64    | 387/502    | 17.17 | 77           |
| 낙동        | 8/16 | 69.2 | 18.4 | 9.8      | 47.67    | 371/467    | 20.13 | 79           |
| FCA8      | 8/18 | 79   | 16   | 9        | 40.44    | 239/364    | 20.87 | 65           |
| FCA9      | 8/27 | 65   | 18   | 5        | 60       | 134/300    | 25.02 | 45           |
| FCA47     | 8/28 | 59   | 11   | 5        | 31.8     | 89/159     | 19.19 | 56           |
| FCA7-1    | 8/09 | 68   | 19   | 9        | 44.78    | 289/403    | 20.76 | 70           |
| FCA7-2    | 8/09 | 63   | 19   | 12       | 41.67    | 379/500    | 20.58 | 74           |
| FCA18-1   | 8/16 | 63   | 19   | 10       | 32.4     | 274/324    | 18.50 | 85           |
| FCA18-2   | 8/16 | 68   | 17   | 8        | 40.38    | 227/323    | 18.83 | 70           |
| FCA8      | 8/23 | 55   | 20   | 4        | 32.75    | 53/131     | 23.58 | 69           |
| FCA10     | 8/27 | 70   | 14   | 4        | 58.25    | 168/233    | 22.83 | 72           |
| FCA22     | 8/22 | 61   | 17   | 7        | 38.14    | 185/267    | 27.49 | 69           |



표 8과 표 9에서 보는바와 같이 FCA 전환벼에 있어서는 대조구인 낙동벼보다 개화시기가 더 당겨지지 않았다. 오히려 대조구에서의 출수일이 8월 25일에 비하여 FCA 전환체는 오히려 출수일이 1주에서 2주정도 늦게 개화가 되었다. RT-PCR 결과(그림 37)에 의하면 대조구나 FCA 전환벼에서의 FCA 유전자 발현에 차이가 없는 것을 보면 삽입된 FCA 유전자의 발현이 극히 미약한 것처럼 사료된다.

## 7. FCA 유전자 전환벼 분석

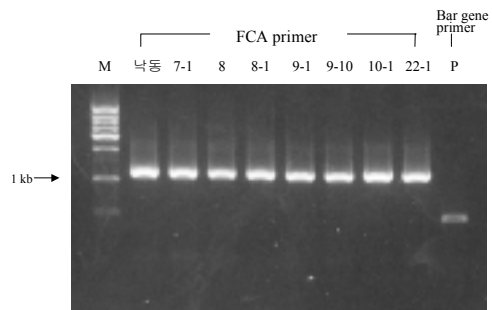
### 가. PCR 분석을 이용한 형질전환벼의 삽입유전자 확인

FCA 유전자 전환벼의 확인을 위하여 PCR방법을 이용하였다. PCR 반응에 이용한 primer는 형질전환에 사용한 낙동벼(대조구)의 염색체 유전자에서 1237 bp를 증폭하고 삽입유전자(FCA)에서는 499 bp를 증폭하도록 고안되어 낙동벼 본래의 유전자와 삽입유전자의 구별이 가능하게 하였다. PCR은 50 ng의 genomic DNA, 10 pmole primer, 1 unit의 Taq polymerase가 포함된 25 ul의 반응액으로 94°C 1분, 56°C 1분, 72°C 2분의 연속반응을 30회 반복하여 수행하였다. 반응 후 8 ul의 반응액을 전기영동하여 삽입단편 유무를 확인하였다.

총 50개의 유전자 전환벼(T2)를 대상으로 PCR 분석을 한 결과 대조구는 낙동벼를 negative control(-)로 사용하였고 positive control(그림38, +)은 형질전환 벡터에 클론된 FCA 유전자를 이용하였다. 그림 39에서 보는바와 같이 FCA cDNA가 형질전환된 형질전환벼의 경우는 PCR로 증폭한 결과 두 개의 DNA 단편(1237bp와 499bp)을 보였는데 이것으로 FCA cDNA가 삽입된 것을 확인할 수가 있었다.

표 10. GMO 포장에서의 FCA 형질전환체(T2)의 특성

| 개체명     | 출수<br>일 | 간장 | 수장 | 주당<br>수수 | 수당<br>입수 | 정수/총갯수     | 천립중   | 등숙률<br>(임실률) |
|---------|---------|----|----|----------|----------|------------|-------|--------------|
| 소백      | 8/09    | 59 | 25 | 16       | 93.5     | 1407/1496  | 23.50 | 94           |
| 낙동      | 8/25    | 84 | 24 | 15       | 100.17   | 1311/1503  | 19.58 | 88           |
| FCA7-1  | 8/25    | 82 | 25 | 11       | 88.73    | 731/976    | 23.61 | 75           |
| FCA7-2  | 8/26    | 90 | 22 | 21       | 78.29    | 1374/1644  | 22.79 | 84           |
| FCA7-3  | 8/24    | 87 | 29 | 16       | 96.81    | 1160/1549  | 22.55 | 75           |
| FCA7-4  | 8/24    | 91 | 21 | 18       | 48.78    | 695/878    | 24.22 | 79           |
| FCA7-5  | 8/24    | 85 | 27 | 15       | 93.47    | 1165/1402  | 25.10 | 83           |
| FCA7-6  | 8/24    | 91 | 20 | 23       | 88.87    | 1662/2044  | 23.58 | 81           |
| FCA7-7  | 8/27    | 78 | 24 | 22       | 80.73    | 1415/1776  | 22.86 | 80           |
| FCA9-1  | 9/05    | 77 | 18 | 24       | 80.96    | 21236/1943 | 20.15 | 64           |
| FCA9-2  | 9/08    | 72 | 23 | 17       | 78.65    | 803/1337   | 18.69 | 60           |
| FCA9-3  | 9/07    | 75 | 18 | 18       | 91       | 1124/1638  | 20.08 | 69           |
| FCA9-4  | 9/06    | 85 | 18 | 9        | 88.11    | 479/793    | 20.14 | 60           |
| FCA9-5  | 9/05    | 85 | 15 | 17       | 103.76   | 1105/1764  | 20.57 | 63           |
| FCA9-6  | 9/07    | 75 | 13 | 14       | 76.14    | 666/1066   | 21.72 | 62           |
| FCA9-7  | 9/06    | 80 | 20 | 13       | 106.31   | 929/1382   | 21.14 | 67           |
| FCA9-8  | 9/06    | 78 | 12 | 17       | 82.76    | 981/1407   | 19.03 | 70           |
| FCA9-9  | 9/06    | 76 | 19 | 13       | 94.31    | 833/1226   | 21.77 | 68           |
| FCA9-10 | 9/04    | 73 | 16 | 9        | 87.22    | 452/785    | 18.70 | 58           |
| FCA9-11 | 9/06    | 73 | 19 | 18       | 83.27    | 1002/1499  | 20.65 | 67           |
| FCA9-12 | 9/03    | 73 | 23 | 14       | 80.28    | 806/1124   | 22.33 | 72           |
| FCA8-1  | 8/26    | 71 | 16 | 14       | 65.14    | 660/912    | 23.04 | 72           |
| FCA8-2  | 9/02    | 65 | 13 | 5        | 53       | 162/265    | 22.12 | 61           |
| 일품      | 8/26    | 65 | 25 | 15       | 85.86    | 989/1254   | 24.16 | 77           |
| FCA10-1 | 9/03    | 73 | 14 | 12       | 66       | 597/792    | 21.03 | 75           |
| FCA10-2 | 9/03    | 71 | 14 | 5        | 52       | 128/260    | 18.73 | 49           |
| FCA10-3 | 9/04    | 75 | 19 | 20       | 83.75    | 1069/1675  | 20.98 | 64           |
| FCA10-4 | 9/06    | 73 | 10 | 15       | 77.93    | 812/1169   | 22.19 | 69           |
| FCA10-5 | 9/04    | 79 | 16 | 13       | 80.38    | 708/1045   | 22.28 | 68           |
| FCA10-6 | 9/08    | 65 | 17 | 10       | 53.1     | 259/531    | 19.42 | 49           |
| FCA10-7 | 9/04    | 74 | 14 | 14       | 68       | 608/952    | 21.35 | 64           |
| FCA17-1 | 8/24    | 85 | 24 | 16       | 95.25    | 1123/1524  | 23.64 | 74           |
| 윤두      | 8/09    | 72 | 31 | 14       | 107.2    | 901/1501   | 24.57 | 67           |
| FCA11-1 | 9/03    | 79 | 18 | 14       | 89.93    | 681/1259   | 22.21 | 54           |
| FCA22-1 | 9/06    | 75 | 21 | 15       | 82.6     | 852/1239   | 20.00 | 69           |
| FCA22-2 | 9/06    | 74 | 15 | 20       | 64.1     | 770/1282   | 19.48 | 60           |



M: 1kb ladder marker  
낙동 : non-transformant  
7-1 ~ 22-1 : FCA transformant (FCA primer)  
P(7-1) : positive control (bar gene primer)

그림 37. FCA 전환체(T2)의 RT-PCR

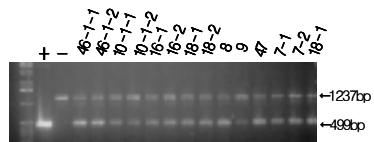
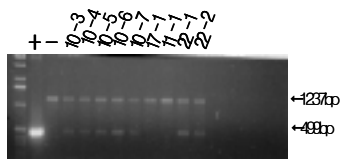
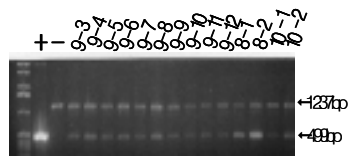
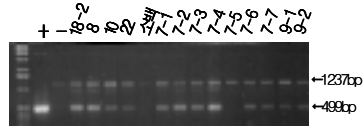


그림 38. FCA 유전자 전환체의 PCR 분석 결과

+ : positive control (FCA 유전자)

- : negative control (낙동)

18-2 - 22-2: 전환체

50개체중에서 FCA7-5와 FCA11-1과 FCA17-1은 1237bp의 밴드 1개만 증폭되었다. 그림38의 positive control(+)에서 499 bp의 삽입된 FCA 유전자단편이 증폭되었고 negative control(-)에서 낙동벼 자체가 갖고있는 1237 bp의 band가 증폭되었다. 분석대상 시료 50개 모두 1237 bp의 band가 증폭되었으나 4개(소백, 7-5, 17-1, 11-1)에서 삽입유전자 단편인 499 bp가 증폭되지 않았다. 이들 4개중 대조구와 동격인 소백을 제외하면 49개중 46개에서 FCA 유전자 삽입단편을 확인하였다.

#### 나. Southern hybridization 분석을 통한 형질전환벼의 확인

형질전환벼의 염색체 DNA 5 ug을 제한효소 Eco RI으로 처리하여 전기영동하고 0.4 N NaOH 용액을 사용하여 capillary법으로 nylon membrane에 transfer하였다. Hybridization은 방사선동위원소로 표지된 FCA 유전자를 probe로 사용하여 65 oC에서 16시간 수행하였다. 실험방법은 Sambrook 등의 molecular cloning에 기술된 방법에 준하여 실시하였다.

실험방법에서 기술하였듯이 5 ug의 벼 genomic DNA를 분리하여 제한효소 Eco RI으로 처리한 후 1.2 % agarose gel 전기영동으로 분리하였다(그림 39). 모두 50개의 시료와 낙동 및 일품벼가 분석되었다.

Southern hybridization 분석결과를 그림40에 나타내었고 낙동과 일품벼가 대조구로 사용되었고 약 6 kb 위치에서 자체의 FCA 유전자 signal이 확인되었다. 전환벼의 삽입유전자 단편은 약 2.3 kb 위치에서 확인되었으며 film에서 확인된 signal의 강도와 단편의 크기를 고려할 때 단일 유전자삽입개체도 확인되었고 10개 이상의 삽입유전자가 도입된 전환체도 다수가 확인되었다. 단일유전자 삽입으로 추정되는 전환체는 10-1-1, 9, 10, 22, 7-5, 9-1, 9-3, 9-4, 9-6, 9-7, 9-8, 9-9, 9-10, 9-12, 47, 10-3, 10-4, 10-6등 18개로 생각된다. 한편 10개 이상의 유전자 삽입체로 추정되는 것은 18-2, 8, 47, 18-1, 18-2, 8, 8-1, 8-2등 8개로 추정된다. Southern 분석결과와 PCR 분석결과를 비교한 결과 PCR에서 삽입단편이 확인되지 않은 3개(7-5, 17-1, 11-1)중 17-1에서는 signal이 확인되지 않아 일치하는 결과를 보여주었다. 그러나 PCR에서 미확인된 7-5와 11-1은 southern 분석결과 각각 단일유전자 삽입체 및 2개 유전자 삽입체로 추정

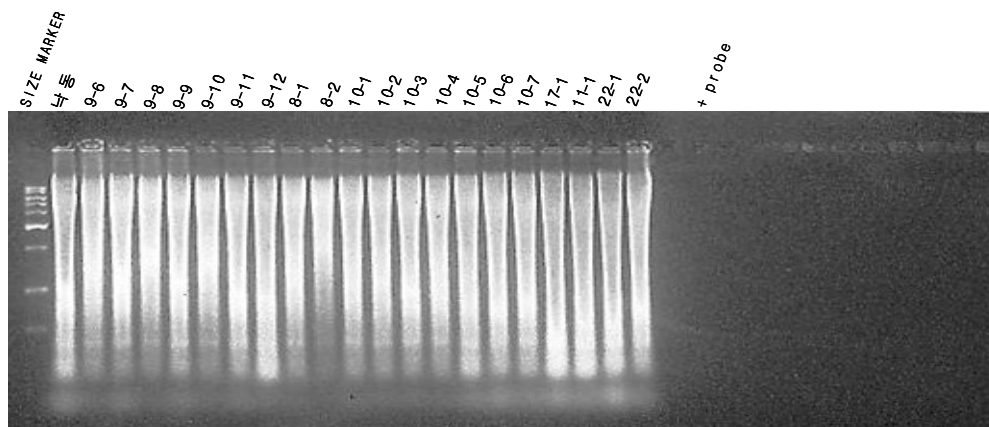
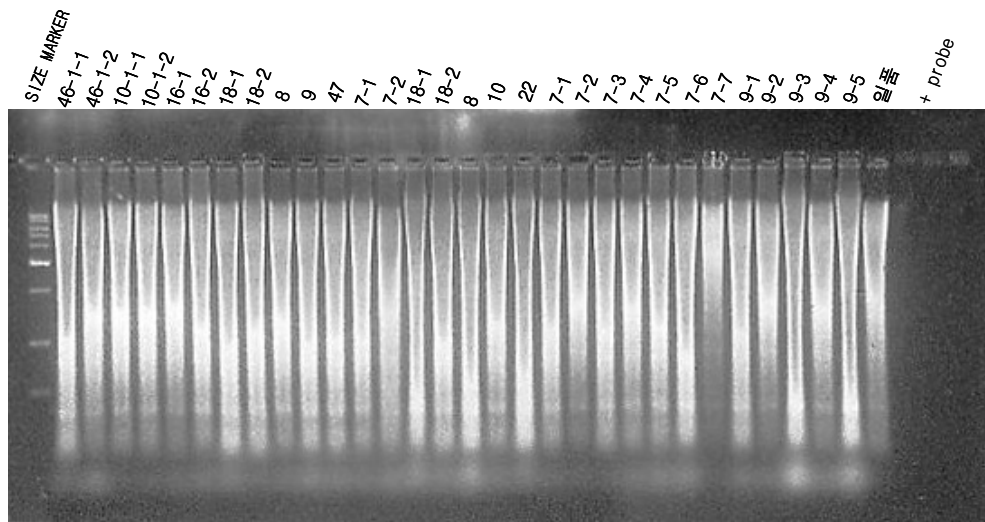


그림 39. 염색체 DNA를 제한효소 Eco RI 처리 후 전기영동한 결과  
 Size marker: 1 kb ladder; 일품, 낙동: control; + probe: hybridization에 사용  
 한 프로브; 46-1-1 - 22-2: 분석에 사용된 형질전환벼

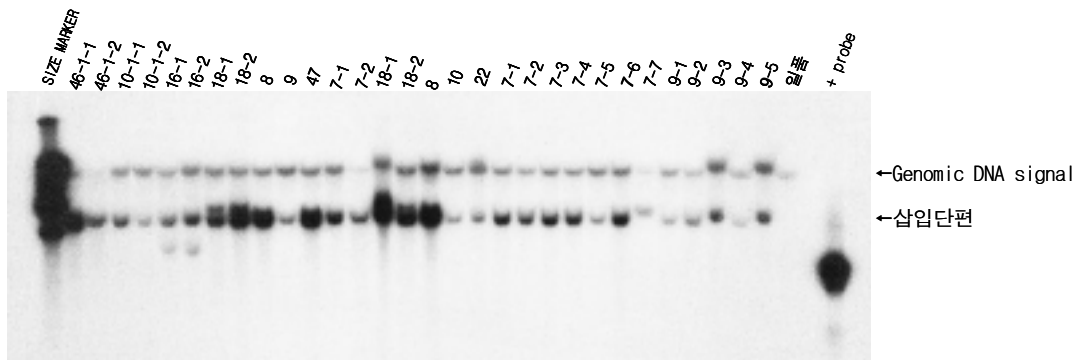
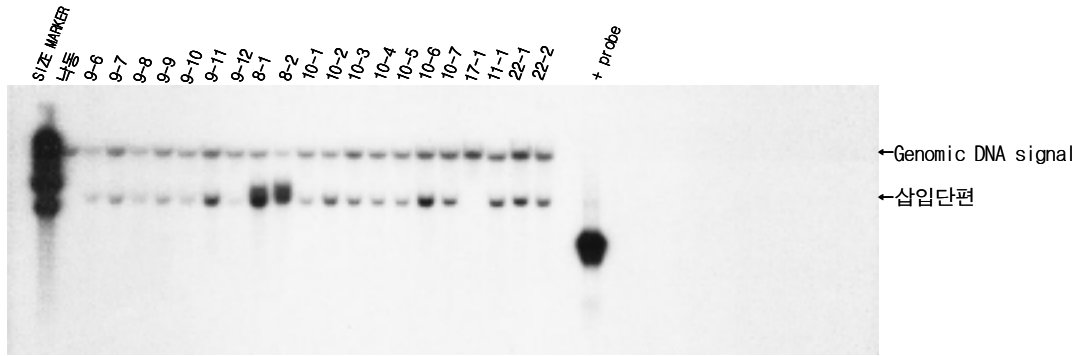


그림 40. Genomic DNA의 southern hybridization 결과

일품, 낙동: control

46-1-1 - 22-2: 분석에 사용된 형질전환벼

+ probe: hybridization에 사용한 프로브

되어 이것은 PCR 반응의 실패 또는 FCA 유전자의 벼 염색체로의 삽입시에 DNA의 재배열에 의한 것으로 여겨진다.

#### 8. CO-like 유전자의 벼 형질전환

CO-like 유전자의 순방향 전환벡터를 낙동벼 calli에 3차례 형질전환 하였다. 그중 일차 형질전환 실험에 사용된 약 500 개의 calli에서 2N6-CP 선발배지와 MS-CP 재분화 배지에서 54 개체의 벼가 분화되었다. 이차 및 삼차의 형질전환에서는 16 개체 및 7 개체가 선발되었고 현재 계속적인 재분화가 진행중이다. 역방향 유전자의 형질전환은 2차에 걸쳐 형질전환실험이 수행되었고 일차 실험결과 현재 28 개체가 재분화 되었다. Basta 처리 결과 잠정적인 CO-like 유전자의 전환체 모두가 Basta에 저항성을 보여 전환체 모두가 CO-like 유전자가 삽입되었음을 확인하였다.

##### 가) PCR을 이용한 CO-like 유전자의 도입 확인

재분화 되어 온실에 이식된 벼에서 도입유전자를 확인하기 위하여 PCR을 이용하였다. PCR은 50 ng의 genomic DNA, 10 pmole의 COLUP primer, 10 pmole의 COLDN primer, 1 unit의 Taq polymerase가 포함된 25 ul의 반응액으로 94°C 1분, 56°C 1분, 72°C 2분의 연속반응을 30회 반복하여 수행하였다. 반응 후 8 ul의 반응액을 전기영동하여 삽입단편 유무를 확인한 결과 총 28개의 순방향 전환벼 모두 약 1 kb의 삽입단편이 확인되었다(그림 41). 한편, CO-like 유전자의 역방향 전환벼 11개체를 위와 동일한 방법으로 PCR한 결과 4개체에서 유전자가 확인되었는데(그림 42) 이는 선발마커인 basta 저항성유전자가 모두증폭된 결과와 상이하여 유전자의 재조합 가능성이 제기된다.



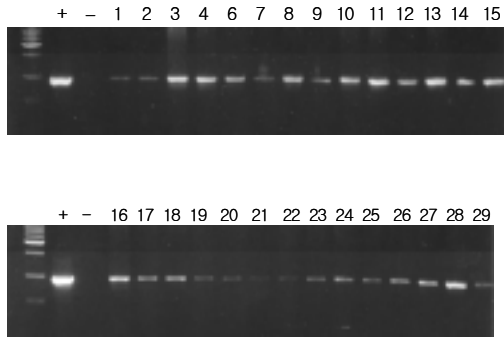


그림 41. CO-like 유전자의 순방향삽입 전환체의 PCR분석 결과  
 +: positive control (CO-like gene), -: negative control (낙동)  
 1 - 29: 형질전환체

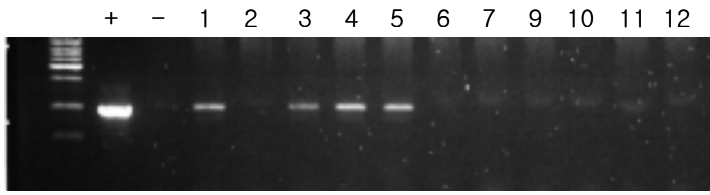


그림 42. CO-like 유전자의 역방향삽입 전환체의 PCR 분석결과

+: positive control, -: negative control (낙동)

1 - 12: 역방향 유전자 전환체

나) Southern hybridization 분석을 통한 CO-like 유전자 형질전환체의 확인

실험방법에서 기술하였듯이 5 ug의 벼 genomic DNA를 분리하여 제한효소 Eco RV으로 처리한 후 1.2 % agarose gel 전기영동으로 분리하였다 (그림 43). 모두 28개의 순방향 유전자 전환체시료가 분석되었으며 낙동벼가 대조구로 사용되었다. Hybridization의 probe는 1 kb의 CO-like 유전자를 이용하였고 Southern hybridization 분석결과를 그림8에 나타내었다. 약 4 kb 위치에서 도입된 CO-like 유전자 signal이 확인되었고 화살표머리로 표시된 부위에 낙동벼 자체가 갖고있는 상동유전자가(약 6kb와 1.5kb 위치)검색되었다. X-ray film에서 확인된 signal의 강도와 단편의 크기를 고려할 때 단일 유전자 삽입개체(그림45, lane1, 7, 8 등)도 확인되었고 5개 이상의 삽입유전자가 도입된 전환체도 다수가(그림 44, lane 9, 13, 15, 28) 확인되었다.

CO-like 유전자가 역방향으로 삽입된 전환체의 분석결과 11개의 시료중 4개에서 유전자 도입이 확인되었다. 그림 9의 lane 1, 3, 4, 5번의 별표위치(약 4 kb 크기)에서 유전자가 확인되었고 대조구로 사용된 낙동 및 lane 2와 lane6 - 12의 화살표머리 위치에서 낙동벼 자체의 상동유전자가 검색되었다. 위의 순방향 전환체의 결과(그림45)와 비교할 때 6 kb와 1.5 kb 이외의 band가 나타났는데 이는 대조구인 낙동에서 두 개의 강한 band가 나타남을 참고할 때 불충분한 제한효소처리의 결과로 추정된다.

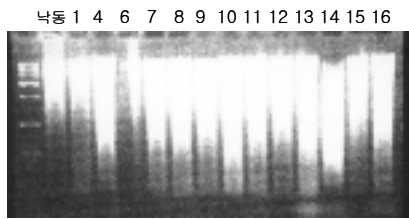
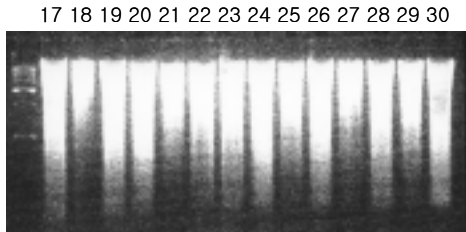


그림 43. CO-like 전환체 DNA의 Eco RV효소 처리후의 결과

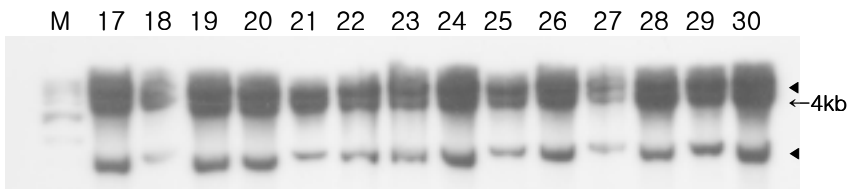
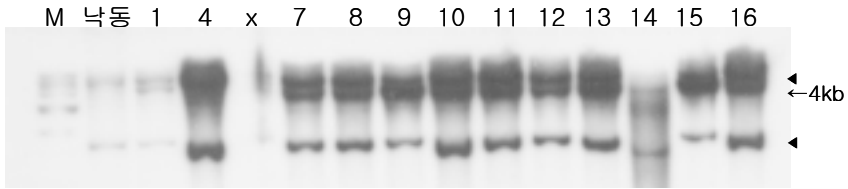


그림 44. CO-like 순방향 유전자 전환체의 southern 분석의 결과  
M: size marker, 1 - 30: 형질전환체 시료

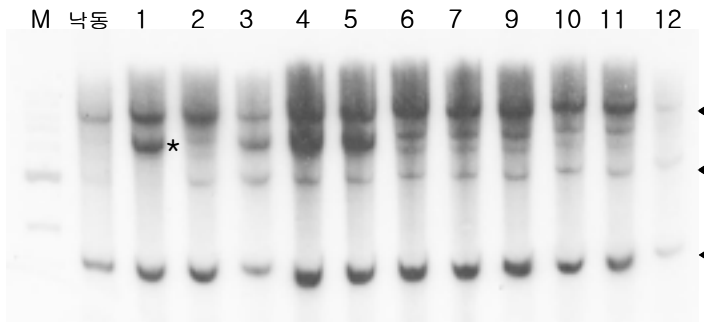


그림 45. CO-like 역방향 유전자 전환체의 southern 분석  
 낙동: 대조구, 1 - 12: 유전자 전환체

#### 4. Hd1 유전자의 벼 형질전환

Hd1 유전자의 형질전환은 위에서 언급한 CO-like 유전자와 동일한 방법으로 수행되었고 현재 역방향 유전자 전환벼 16개체가 생산되었다. 역방향 전환체 역시 Basta 처리시에 저항성을 나타냄으로써 16개 모두가 Hd1 벉터가 삽입되었음을 보여주었다. 순방향유전자 전환벼는 현재 형질전환 및 증식실험을 계속하고있다.

##### 가) PCR을 이용한 Hd1 유전자의 확인

현재 분석실험 진행중이다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연차별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

1차년도 목표는 애기장대 FCA에 대한 벼의 homolog를 찾고 그 유전자에 대한 기능을 분석하는 것으로 본 연구팀은 벼 FCA에 대한 full-length cDNA와 유전자를 찾아 염기서열을 완전히 분석하고, 벼 FCA 유전자의 alternative splicing pattern과 조직 특이적 및 발생시기별 발현양상을 Northern blot에 의해 분석하였다. 이러한 분석을 통해 벼 FCA 유전자의 구조나 기능이 기존에 밝혀진 애기장대 FCA 유전자와 놀라우리만큼 유사하다는 사실을 알았으며, 진화적으로 유연관계가 먼 서로 다른 식물들간에도 유전자의 특징이 보존되어 있다는 사실을 밝혔다. 이러한 사실에 비추어 볼 때 FCA 유전자에 대한 분자생물학적 연구와 이용 가능성은 여러 식물체에 보편적으로 적용될 수 있다는 가능성을 제시한다고 본다. 또한, 벼 CO 유전자에 대한 cDNA 확보는 연구과정중에 일본 그룹에 의해 발표가 되어 cDNA 확보대신 genomic clone을 분양받아 형질전환체를 만들기로 결정하였다. 그 외에 벼 CO 유사 유전자중 하나인 CO-like 유전자에 대한 확보와 발현양상을 분석하였다.

2차년도의 목표는 벼 FCA 유전자가 애기장대 FCA 유전자의 기능적인 homolog인지를 밝히기 위해 애기장대 fca-1 돌연변이체에 벼 FCA 유전자를 과다발현시켜 개화시기가 회복되는지를 알아보고자 하였다. 그 결과 벼 FCA 유전자가 애기장대 fca-1 돌연변이체의 개화시기를 앞당겨 기능적인 homolog임을 입증하였다. 또한, 분자생물학적으로도 벼 FCA 유전자가 애기장대 개화시기 경로에 있어 FCA의 하위단계에 있는 유전자의 발현에 영향을 미친다는 사실도 구명하였다. 벼 FCA 유전자의 벼 염색체내의 위치는 염색체 9의 상단에 존재함을 알았으며, 기존의 벼 개화시기조절 유전자에 대한 QTL은 이 부분에서 밝혀진 바가 없었다. 벼 FCA 과다발현 형질전환체는 성공적으로 1차년도에 걸쳐 수행되었으며, 벼 CO와 COL 유전자에 대한 형질전환백터를 준비



하여 형질전환을 시도하였다.

3차년도 목표는 벼 FCA형질전환체에 대한 형태학적, 분자생물학적, 분석과 유용성 검증이었다. 벼 FCA 형질전환체의 경우 출수기가 기존의 조생종과 비교시 더 빨라지지 않지만 형질전환에 사용한 낙동벼 보다는 1주정도 빠른 것도 있었고 일반적으로는 차이가 없으나 오히려 1-2주 정도는 늦은 경우도 있었다. 또한, 형태학적으로 벼 FCA 형질전환체의 변화는 확인하지 못했다. 그러나, 이러한 결과는 최근에 애기장대 FCA 유전자를 처음으로 밝힌 영국그룹이 외국 저명 학술지인 EMBO에 밝힌 결과와 너무 유사하였다. 애기장대의 연구결과에 비추어보면 본 연구팀의 결과가 신빙성이 있다는 것을 뒷받침해준다. 본 연구팀은 애기장대 개화시기 조절 유전자 중 하나인 FCA유전자를 벼에 찾아 극조생 벼품종을 개발하려 했으나, 벼 FCA유전자의 경제적, 산업적 유용성은 확인할 수가 없었다. 하지만, 벼 개화시기 조절 연구에 대한 기초적 연구결과의 축적이라는 면에서는 진화적으로 서로 다른 식물체에서 개화시기 조절 경로가 상당히 유사하다는 사실을 구명하였다. 또한, 벼 FCA유전자이외에 벼 CO와 COL유전자, FDRMADS8유전자, 그리고 애기장대 FT유전자에 대한 형질전환체도 만들어 분석 중에 있다.

본 연구팀의 궁극적 목표는 세 가지이다.

첫째, 벼 개화시기조절 유전자 확보 및 특허출원

둘째, 벼 개화시기 조절기작 연구

셋째, 형질전환 벼 생산

첫 번째 목표인 벼 개화시기 조절 유전자에 대한 확보는 FCA를 비롯해서 FDRMADS8, Os COL 등을 확보하였으며 FDRMADS8과 Os COL유전자의 경우 기능을 확인한 후 특허를 출원할 예정이다. 두 번째 목표인 벼 개화시기 조절기작 연구는 최근의 일본그룹에 의한 벼 개화시기 조절 연구와 비교시 차별성이 있으며, 아직까지 벼에서는 보고가 되지 않은 애기장대 개화시기 경로 중 하나인 자발적 경로가 벼에서도 존재한다는 사실을 세계처음으로 입증하였

다. 세 번째 목표인 형질전환 벼 생산은 벼 FCA 유전자에 대해서는 개발하였지만 그 경제적 유용성은 입증하지 못하였다. 하지만, 학문적 유용성 측면에서는 벼 FCA 형질전환체의 연구는 서로 다른 식물인 애기장대에 있어서의 결과와 비교, 분석할 수 있다는 점에서 의의가 있다고 할 수 있다. 그 외에도 Hd1, Os COL, FDRMADS8 애기장대 FT 유전자에 대해 벼 형질전환체 (T0)를 만들었다. 본 연구팀은 위 세가지의 최종평가에 비추어 볼 때 90%이상의 달성을 했다고 생각한다.

## 제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

### 1. 기술적 측면

가. 벼는 보리, 옥수수, 밀과 같은 다른 작물과 비슷한 유전정보를 가지고 있으므로 벼 개화시기조절에 대한 연구결과는 유전자연구가 어려운 다른 작물에 응용될 가능성이 아주 높을 것으로 기대한다.

나. 본 연구를 통하여 얻어지는 FCA유전자의 염색체내 위치를 나타내는 유전자지도를이용하여 기존의 전문적인 교배육종연구에 크게 기여할 것으로 기대한다.

다. 형질전환벼의 개발은 원치않는 형질의 연관으로 인한 교배육종의 한계점을 극복할 수 있을 것으로 기대한다.

### 2. 경제 · 산업적 측면

가. 벼 개화시기(출수기)조절에 관련된 유전자의 국제지적재산권을 획득함으로써 신품종개발에 독자적인 운영이 가능할 것으로 생각한다.

나. 농촌 노동력과 경작지 감소에 따른 생산성 감소를 극복하여 국내 쌀시장 개방에 대처하기 위한 국제 경쟁력을 확보할 것이며, 남·북한 통일을 대

비한 식량위기 문제를 극복할수 있는 기반을 제공할 것으로 기대한다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구과제의 결과가 벼의 조기개화를 유도하는데 이용할수 있는 것으로 판단되며, 극조생벼 품종개발에 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 극조생 벼품종은 국내에서도 경쟁력있는 2모작이 실현가능하도록 할 것이며, 보리, 옥수수, 밀과 같은 타작물의 개화시기 조절 연구에도 응용될 수 있어, 이와 같은 타작물의 분자육종에 활용될 수 있을 것이다. 본 연구결과로 얻어질 수 있는 극조생종 벼종자가 실제로 벼농사를 하는 농민들에게 보급되기까지는 육종학자들에 의한 장기간의 포장시험을 통한 품종의 안정화가 이루어져야 할 것으로 보고 있다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구팀의 책임자는 미국 SALK 연구소에 있는 Weigel (현재는 독일 Max Planck Institute에 재직)로부터 애기장대 개화시기 조절유전자중 하나인 FT 유전자를 분양받아 벼에서 형질전환을 시도하였다.

또한, 협동연구팀에서도 일본의 Sasaki로부터 애기장대 CO에 대한 homolog 인 벼의 Hd1 genomic clone을 분양받아 벼에서 형질전환을 시도하였다.

## 제 7 장   참고문헌

1. Song J, Yamamoto K, Shomura A, Itadani H, Zhong HS, Yano M, Sasaki T. 1998. Isolation and mapping of a family of putative zinc-finger protein cDNAs from rice, DNA Res. 5(2), 95-101.
2. Naoki Sentoku, Yutaka Sato, Nori Kurata, Yukihiro Ito, Hidemi Kitano, and Makoto Matsuoka. 1999. Regional Expression of the Rice *KN1*-Type Homeobox Gene Family during Embryo, Shoot, and Flower Development. The Plant Cell. 11, 1651-1663.
3. 김태수, 박홍규, 양보갑. 1996. 남부고냉지 벼 생력재배 연구 : 남부고냉지 벼 직파재배 기술개선. 시험연구보고서 1995 전작과. 목포시험장/ 농촌진흥청 호남농업시험장 p.568-573.
4. 조영철외. 1997. 통일대비 벼 재배법 개선연구 : 한·중 벼 조숙내냉성 유전자원 특성검정. 시험연구보고서 1997/ 경기도 농촌진흥원 p.221-225.
5. 한희석. 1997. 북한지역적용 벼 다수확 재배기술 개발. 시험연구보고서 1997 수도권/ 농촌진흥청작물시험장 p.727-731.
6. 류인수, 최돈향, 윤성호. 1996. 북한의 수도작 농업기후지대 구분. 한국국제농업개발학회지 8, 206-215.
7. 양보갑외. 1997. 벼 조숙 양질 다수성 신품종 “삼천벼”. 식량작물연구논문집. 39, 83-89.
8. 문헌팔외. 1998. 벼 극조숙 흑자색 유색미 신품종 “흑진주벼”. 식량작물연구논문집 40, 67-74.

9. 서광기외. 1996. 벼 생식생장기 한발에 따른 품종별 출수 및 수량 반응. 경기농업연구 8, 13-19.
10. 문헌팔. 1998. 극조생 양질 유색미 - 흑진주벼 -. 연구와 지도 39, 12-13.
11. 유해영. 1999. 극조생종 내냉성 양질미 '운두벼'. 연구와 지도 40, 21-22.
12. Yong-Hwan Moon, Hong-Gyu Kang, Ji-Young Jung, Jong-Seong Jeon, Soon-Kee Sung, and Gynheung An. 1999. Determination of the Motif Responsible for Interaction between the Rice APETALA1/AGAMOUS-LIKE9 Family Proteins Using a Yeast Two-Hybrid System. *Plant Physiology*. 120, 1193-1203.
13. Hong-Gyu Kang, Jong-Seong Jeon, Sichul Lee and Gynheung An. 1998. Identification of class B and class C floral organ identity genes from rice plants. *Plant Molecular Biology*. 38, 1021-1029.
14. Junko Kyoizuka, Saeko Konishi, Keisuke Nemoto, Takeshi Izawa, and Ko Shimamoto. 1998. Down-regulation of RFL, the FLO/LFY homolog of rice, accompanied with panicle branch initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1979-1982.
15. David A. Laurie. 1997. Comparative genetics of flowering time. *Plant Molecular Biology* 35, 167-177.
16. Postma-Haarsma AD, et al. 1999. Characterization of the KNOX class homeobox genes Oskn2 and Oskn3 identified in a collection of cDNA libraries covering the early stages of rice embryogenesis. *Plant Mol Biol*. 39, 257-71.

17. 박석홍. 1999. 벼의 냉해 발생현상과 방지대책. 연구와 지도 40, 23-26.
18. 양보갑. 1999. 벼 조숙 양질 내냉성 '인월벼'. 연구와 지도 40, 25-26.
19. 고재권외. 1996. 호남지역 벼 고품질 안전다수성 신품종개발 : 벼 육성계통 주요특성 검정시험. 시험연구보고서 1995 전작과. 목포시험장/ 농촌진흥청 호남농업시험장 p.162-200.
20. Macknight, R., Bancroft, I., Page, T., Lester, C., Schmidt, R., Love, K., Westrpahl, L., Murphy, G., Sherson, S., Cobbett, C., and Dean, C. (1997) FCA, a Gene Controlling Flowering Time in Arabidopsis, Encodes a Protein Containing RNA-Binding Domains. *Cell* 89:737-745
21. Chung, YY, Kim, SR, Finkel, D, Yanofsky, MF, and An, G. (1994) Early flowering and reduced apical dominance result from ectopic expression of a rice MADS box gene. *Plant Mol. Biol.* 26:657-665.
22. Bell, L.R., Maine, E.M., Schedl, P., and Cline, T.W. (1988). Sex-lethal, a *Drosophila* sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA splicing and sequence similarity to RNA binding proteins. *Cell* 55,1037-1046.
23. Koushika, S.P., Lisbin, M.J., and White, K. (1996). ELAV, a *Drosophila* neuron-specific protein, mediates the generation of an alternatively spliced neural protein isoform. *Curr. Biol.* 6, 1634-1641.
24. Lee, I., Aukerman, M.J., Gore, S.L., Lohman, K.N., Michaels, S.D., Weaver, L.M., John, M.C., Feldmann, K.A., and Amasino, R.M. (1994). Isolation of LUMINIDEPENDENS: a gene involved in the control of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6, 75-83.



25. Page, T, Macknight, R, Yang, C-H. and Dean C. (1999) Genetic interactions of the Arabidopsis flowering time gene *FCA*, with genes regulating floral initiation. *The Plant Journal*. 17(3),321-239
26. Simon, R., Igeno, I. M., and Coupland, G. (1996) Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature* 384, 59-62.
27. Aukerman, M. J., Lee, I., Weigel, D., and Amasino, R. M. (1999). The Arabidopsis flowering-time gene *LUMINIDEPENDENS* is expressed primarily in regions of cell proliferation and encodes a nuclear protein that regulates *LEAFY* expression. *Plant J* 18, 195-203.
28. Blazquez, M. (2000). Flower development pathways. *J Cell Sci* 113, 3547-3548.
29. Blazquez, M. A., and Weigel, D. (1999). Independent regulation of flowering by phytochrome B and gibberellins in Arabidopsis. *Plant Physiol* 120, 1025-32.
30. Blazquez, M. A., and Weigel, D. (2000). Integration of floral inductive signals in Arabidopsis. *Nature* 404, 889-92.
31. Clarke, J. H., Mithen, R., Brown, J. K., and Dean, C. (1995). QTL analysis of flowering time in Arabidopsis thaliana. *Mol Gen Genet* 248, 278-86.
32. Izawa, T., Oikawa, T., Tokutomi, S., Okuno, K., and Shimamoto, K. (2000). Phytochromes confer the photoperiodic control of flowering in rice (a short-day plant). *Plant J* 22, 391-9.

33. Levy, Y. Y., and Dean, C. (1998). Control of flowering time. *Curr Opin Plant Biol* 1, 49-54.
34. Lin, C. (2000). Photoreceptors and regulation of flowering time. *Plant Physiol* 123, 39-50.
35. Macknight, R., Bancroft, I., Page, T., Lester, C., Schmidt, R., Love, K., Westrpahl, L., Murphy, G., Sherson, S., Cobbett, C., and Dean, C. (1997). FCA, a Gene Controlling Flowering Time in Arabidopsis, Encodes a Protein Containing RNA-Binding Domains. *Cell* 89, 737-745.
36. Meyerowitz, E. M., Bowman, J. L., Brockman, L. L., Drews, G. N., Jack, T., Sieburth, L. E., and Weigel, D. (1991). A genetic and molecular model for flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Dev Suppl* 1, 157-67.
37. Page, T., Macknight, R., Yang, C. H., and Dean, C. (1999). Genetic interactions of the Arabidopsis flowering time gene FCA, with genes regulating floral initiation. *Plant J* 17, 231-9.
38. Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., and Coupland, G. (1995). The CONSTANS gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* 80, 847-57.
39. Sarma, R. N., Fish, L., Gill, B. S., and Snape, J. W. (2000). Physical characterization of the homoeologous group 5 chromosomes of wheat in terms of rice linkage blocks, and physical mapping of some important genes. *Genome* 43, 191-8.

40. Simpson, G. G., Gendall, A. R., and Dean, C (1999) When to switch to flowering. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 519-50.
41. Song, J., Yamamoto, K., Shomura, A., Itadani, H., Zhong, H.S., Yano, M., and Sasaki, T (1998) Isolation and mapping of a family of putative zinc-finger protein cDNAs from rice. *DNA Res.* 5(2), 95-101.
42. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, and Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* 215:403-410.
43. Feinberg AP and Vogelstein B (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137:266-267.
44. Southern, EM (1975) Detection of specific DNA sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* 50:3-512.
45. Izawa T, Oikiawa T, Sugiyama N, Tanisaka T, Yano M, Shimamoto K (2002) Phytochrome mediates the external light signal to repress *FT* orthologs in photoperiodic flowering of rice. *Genes Dev* 16 : 2006-2020
46. Kojima S, Takahashi Y, Kobayashi Y, Monna L, Sasaki T, Araki T, Yano M (2002) *Hd3a*, a Rice Ortholog of the *Arabidopsis FT* Gene, Promotes Transition to Flowering Downstream of *Hdl* under Short-Day Conditions. *Plant Cell Physiol* 43 : 1096-1105
47. Lee H, Suh SS, Park E, Cho E, Ahn JH, Kim SG, Lee JS, Kwon YM, Lee I (2000) The *AGAMOUS-LIKE 20* MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 15 : 2366-2376
48. Li Z, Pinson SRM, Stansel JW, Park WD (1995) Identification of quantitative trait loci(QTLs) for heading date and plant height in cultivated

rice(*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet 91 : 374-381

49. Macknight R, Duroux M, Laurie R, Dijkwel P, Simpson G, Dean C (2002) Functional significance of the alternative transcript processing of the *Arabidopsis* floral promoter FCA. Plant Cell 14 : 877-888

50. Michaels SD, Amasino RM (2001) Loss of FLOWERING LOCUS C activity eliminates the late-flowering phenotype of FRIGIDA and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. Plant Cell 13 : 935-941

51. Siomi H, Dreyfuss G (1997) RNA-binding proteins as regulators of gene expression. Curr Opin Genet Dev 7 : 345-353

52. Smith CWJ, Patton JG, Nadal-Ginard B (1989) Alternative splicing in the control of gene expression. Annu Rev Genet 23 : 527-577

53. Webster PJ, Liang L, Berg CA, Lasko P, Macdonald PM (1997) Translational repressor bruno plays multiple roles in development and is widely conserved. Genes Dev 11:2510-2521

54. Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, Sasaki T (2000) *Hdl*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene CONSTANS. Plant 12: 2473-2483

55. Scortecci KC, Michaels SD, Amasino RM (2001) Identification of a MADS-box gene, FLOWERING LOCUS M, that represses flowering. Plant J 26(2):229-36.

56. Kozuka J, Konishi K, Nemoto K, Izawa T, and Shimamoto K (1997) Down-regulation of RFL, the FLO/LFY homolog of rice, accompanied with panicle branch initiation

PNAS 95: 1979-1982.

57. Alvarez-Buylla ER, Liljegren SJ, Pelaz S, Gold SE, Burgeff C, Ditta GS, Vergara-Silva F, Yanofsky MF. (2000) MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J.* 24(4):457-66.

58. Sentoku N, Sato Y, Kurata N, Ito Y, Kitano H, Matsuoka M. (1999) Regional expression of the rice KN1-type homeobox gene family during embryo, shoot, and flower development. *Plant Cell.* 11(9):1651-64.

59. Postma-Haarsma AD, Verwoert II, Stronk OP, Koster J, Lamers GE, Hoge JH, Meijer AH. (1999) Characterization of the KNOX class homeobox genes *Oskn2* and *Oskn3* identified in a collection of cDNA libraries covering the early stages of rice embryogenesis. *Plant Mol Biol.* 139(2):257-71.

60. Suarez-Lopez P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F, Coupland G. (2001) *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature.* 26;410(6832):1116-20.

61. Simpson GG, Dijkwel PP, Quesada V, Henderson I, Dean C (2003) *FY* is an RNA 3' end-processing factor that interacts with *FCA* to control the *Arabidopsis* floral transition. *Cell.* 13;113(6):777-87.

62. Quesada V, Macknight R, Dean C, Simpson GG (2003) Autoregulation of *FCA* pre-mRNA processing controls *Arabidopsis* flowering time. *EMBO J.*16;22(12):3142-52.

63. Hayama R, Yokoi S, Tamaki S, Yano M, Shimamoto K (2003) Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature* 17;422(6933):719-22.